

534,800

Rec'd PCT/PTO 12 MAY 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年6月17日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/051266 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/50, 33/15, 37/00, C12M 1/34, C12Q 1/02
(71) 出願人 および
(72) 発明者: 村口 駿 (MURAGUCHI,Atsushi) [JP/JP]; 〒930-0001 富山県富山市明輪町1-108-1301 Toyama (JP). 岸裕幸 (KISHI,Hiroyuki) [JP/JP]; 〒930-0884 富山県富山市五福末広町2556-4-3-101 Toyama (JP). 民谷 栄一 (TAMIYA,Eiichi) [JP/JP]; 〒921-8105 石川県金沢市平和町3-17-14 平和宿舎C58棟13号 Ishikawa (JP). 鈴木 正康 (SUZUKI,Masayasu) [JP/JP]; 〒930-0962 富山県富山市長江本町18-4-54 Toyama (JP).
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012500
(22) 国際出願日: 2003年9月30日 (30.09.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 2002-331031 2002年11月14日 (14.11.2002) JP
特願 2002-346728 2002年11月29日 (29.11.2002) JP
(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

(続葉有)

(54) Title: MICROWELL ARRAY CHIP FOR DETECTING ANTIGEN-SPECIFIC LYMPHOCYTE, METHOD OF DETECTING ANTIGEN-SPECIFIC LYMPHOCYTE AND METHOD OF CLONING ANTIGEN-SPECIFIC LYMPHOCYTE ANTIGEN RECEPTOR GENE

(54) 発明の名称: 抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ、抗原特異的リンパ球の検出法及び製造方法、並びに抗原特異的リンパ球抗原受容体遺伝子のクローニング方法

(57) Abstract: A microwell array chip having plural microwells, containing a test lymphocyte in each microwell and being used for detecting a single antigen-specific lymphocyte, wherein the microwells have such a shape and size that only one lymphocyte is contained in each microwell. A method of detecting an antigen-specific lymphocyte which comprises adding an antigen to each of the microwells of this microwell array chip, thus stimulating the cells and detecting a cell reacting with the antigen.

(57) 要約:

複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体リンパ球を格納し、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するために用いられるマイクロアレイチップであって、前記マイクロウェルは1つのマイクロウェルに1つのリンパ球のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップ。

このマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む、抗原特異的リンパ球の検出方法。

WO 2004/051266 A1



SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ、

抗原特異的リンパ球の検出法及び製造方法、並びに

抗原特異的リンパ球抗原受容体遺伝子のクローニング方法

技術分野

本発明は、抗原特異的リンパ球検出に用いるマイクロウェルアレイチップ及び抗原特異的リンパ球の検出方法及び製造方法に関する。さらに本発明は、抗原特異的リンパ球抗原受容体遺伝子のクローニング方法に関する。

背景技術

従来、抗原特異的リンパ球は図3に示すような96穴プレートを用いて、1穴あたり約200,000個のリンパ球を加えて3日から1週間、抗原の存在下で培養することにより検出していた（「リンパ球機能検索法」矢野純一、藤原道夫編著、中外医学社（1994年）（非特許文献1）及び「免疫実験操作法I、II」右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之編集、南江堂（1995年）（非特許文献2））。

検出方法は

1. 細胞の増殖（³H-thymidineの取り込み、生細胞の検出）
2. 抗体・サイトカインの産生

を測定することによる。

この方法では、約200,000個と言うリンパ球集団の中に抗原特異的

リンパ球が存在することは確認できた。しかし、リンパ球集団中に存在する個々の抗原特異的リンパ球を同定することはできなかった。

これに対して近年、蛍光色素で標識した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に蛍光標識抗原を結合させ、蛍光標識抗原を結合したリンパ球を、フローサイトメータを用いることにより検出する方法が開発され利用されている (Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274:94-96, 1996 (非特許文献3))。この方法では抗原に結合する1個のリンパ球を同定することが可能である。さらに抗原に結合する1個のリンパ球を分取することも可能である。

しかしながら、上記検出方法では、分取するためにはセルソーターという高価で複雑な機器が必要である上に、以下の問題も有る。

- (1) 分取するための機器の条件設定が難しく、細胞を分取するためには機器操作の熟練を要する。
- (2) バックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できない。
- (3) 細胞を分取する効率は低い。
- (4) 頻度の低い細胞を分取するのに時間がかかる。
- (5) 抗原が結合することは確認できるが、抗原が結合したリンパ球

の反応を解析することは難しい。

別の抗原特異的リンパ球検出法として、磁気ビーズに結合した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に磁気ビーズ結合抗原を結合させ、磁石を用いて抗原特異的リンパ球を分取する方法も開発されている (Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H, CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journal of Immunological Methods 125:19-28, 1989 (非特許文献4))。

この方法では、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認できる。しかし、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応(細胞内シグナル伝達、RNA合成、タンパク質合成などの細胞の代謝生理反応)するかを解析することはできなかった。また、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できなかった。

そこで本発明は、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認でき、頻度の低い抗原特異的リンパ球(0.001%以上)も検出でき、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することができ、しかも抗原特異的リンパ球を分取できる抗原特異的リンパ球検出法を提供することを第1の目的とする。

さらに本発明の別の目的は、上記検出法に使用する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ、及び上記検出法を利用した抗原特異的リンパ球の製造方法を提供することにある。

ところで、従来の抗原特異的抗体遺伝子のクローニング方法として、以下の方法が知られている。

(1) 人の場合、末梢Bリンパ球をEBウィルスで形質転換させ株化して抗原特異的抗体を產生している細胞をスクリーニングし、得られた抗原特異的リンパ球細胞株から抗体遺伝子をクローニングする方法がある (Roome AJ, Reading CL. The use of Epstein-Barr virus transformation for the production of human monoclonal antibodies. *Exp Biol* 43:35-55, 1984(非特許文献5)、Carson DA, Freimark BD. Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies. *Adv Immunol.* 38:275-311, 1986(非特許文献6))。この方法の場合、抗原特異的リンパ球細胞株をスクリーニングするのが非効率的であり、かつ細胞培養に1カ月程度かかることから時間がかかり、面倒である。マウスの場合はハイブリドーマを作製することができるが、人の場合は効率のよいハイブリドーマの系は作成されていない。

(2) 別の方法として、バクテリオファージを用いて抗原特異的抗体遺伝子をクローニングする方法がある (Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucolieri RE, Haber E, Crea R, et al. Protein engineering of

antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 85:5879-5883, 1988 (非特許文献 7))。この場合、人のリンパ球より mRNA を抽出し、免疫グロブリンの H鎖と L鎖の cDNA ライブラリーをそれぞれ作製し、一つのファージ DNA に組み込むことにより、ファージで抗体の H鎖と L鎖を発現させる。この H鎖と L鎖の組合せで抗原特異性が決まる。しかし、この系の場合、その組合せはランダムであり、抗原を使ってその抗原に結合する抗体を作っているファージをスクリーニングする。その結果、抗原に結合する抗体を作っているファージが得られれば、抗原特異的抗体遺伝子がクローニングである。しかし、H鎖と L鎖の組合せはランダムなので抗原特異的抗体遺伝子のスクリーニングは非常に非効率的である。例えば、ある抗原に対する抗体の H鎖の cDNA と L鎖の cDNA がライブラリーの中に 10 の 4 乗分の 1 の頻度でそれぞれ存在しているとすると、その抗原に結合できる H鎖と L鎖の組合せは 10 の 8 乗分の 1 になる。また、この系の場合、得られた H鎖と L鎖の組合せが、実際にヒトの体の中でつくられている H鎖と L鎖の組合せと同じであるかどうかも分からぬ。

上述のように、従来の抗原特異的抗体遺伝子のクローニング方法は、非常に効率の悪い方法であった。それでも、頻度が比較的高い抗原特異的リンパ球については、従来の方法でも、相当量の労力を投入すれば、抗原特異的抗体遺伝子をクローニングすることは可能であった。

しかし、従来の方法では頻度の低い抗原特異的リンパ球を同定、選別するということは不可能であった。

そこで本発明は、頻度が比較的高い抗原特異的リンパ球は勿論のこと、頻度の低い抗原特異的リンパ球であっても、簡便に特定の抗原に特異的に反応するリンパ球を選択し、この選択された抗原特異的リンパ球から、抗原特異的抗原受容体遺伝子を効率的にクローニングする方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、クローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子からモノクローナル抗体を製造することを提供すること、及びクローニングされた抗原特異的T細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法を提供することも目的とする。

発明の開示

上記課題を解決する本発明は以下の通りである。

本発明の第1の態様は、複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体リンパ球を格納し、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するために用いられるマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つのリンパ球のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップに関する。

上記本発明の第1の態様のマイクロウェルアレイチップにおいては、以下の態様が好ましい。

(1) 前記マイクロウェルは、円筒形、直方体、逆円錐形、若しくは逆角錐形またはこれらの2つ以上を組合せた形状である、

(2) マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径の1~2倍の範囲であり、かつマイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径の1~2倍の範囲である。

本発明の第2の態様は、1つの被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップに関する。

上記本発明の第2の態様のマイクロウェルアレイチップにおいては、以下の態様が好ましい。

(1) 前記マイクロウェルは、直径5~100 μ mであり、深さ5~100 μ mである、

(2) 前記被検体リンパ球は培養液とともにマイクロウェルに格納されている、

(3) 前記被検体リンパ球は血液由来である、

(4) 前記被検体リンパ球はBリンパ球またはTリンパ球である。

本発明の第3の態様は、上記本発明の第2の態様のマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、被検体リンパ球を刺激し、抗原に反応する被検体リンパ球を検出することを含む、抗原特異的リンパ球の検出方法に関する。

上記本発明の第3の態様の抗原特異的リンパ球の検出方法においては、以下の態様が好ましい。

(1) 抗原に反応する細胞の検出を、Caイオン依存性蛍光色素を用いて行う、

(2) 抗原に反応する細胞の検出を、抗原により刺激され活性化した被検体リンパ球細胞の表面に発現する活性化マーカータンパク質を指標として行う、

(3) 抗原に反応する細胞の検出を、被検体リンパ球細胞内蛍光物質が発する蛍光の偏光度を指標として行う、

(4) 抗原に反応する細胞の検出を、被検体リンパ球細胞の増殖または抗体産生を指標として行う、

(5) 抗原がタンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、糖鎖、または有機高分子化合物である、

(6) 抗原が、細菌、ウィルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲンである。

本発明の第4の態様は、上記本発明の第3の態様である抗原特異的リンパ球の検出方法により検出された抗原に反応する被検体リンパ球をマイクロウェルから回収することを含む、抗原特異的リンパ球の製造方法に関する。

本発明の第5態様は、ある抗原に特異的に反応するリンパ球(以下、抗原特異的リンパ球という)を1個選択し、次いでこの1個の抗原特

異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子をクローニングする方法に関する。

上記本発明の第5の態様の抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法においては、以下の態様が好ましい。

- (1) 前記1個の抗原特異的リンパ球の選択は、1個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次いで、抗原に反応したリンパ球を検出し、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより行う、
- (2) 抗原特異的リンパ球は、頻度が0.1%以下である、
- (3) 抗原特異的リンパ球を、細胞溶解剤を用いて溶解し、RT-PCRを用いて抗原特異的抗原受容体遺伝子を増幅する、
- (4) RT-PCRは、逆転写酵素によるcDNA調製の後、抗原受容体遺伝子用のプライマーミックスを用いてPCRを2回行うことにより行う、
- (5) 抗原特異的リンパ球がBリンパ球またはTリンパ球である、
- (6) 抗原特異的抗原受容体遺伝子が、抗原特異的リンパ球がBリンパ球である場合には免疫グロブリン遺伝子であり、Tリンパ球である場合にはT細胞受容体遺伝子である、
- (7) 抗原特異的リンパ球がBリンパ球であり、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子がクローニングされる、
- (8) 抗原特異的リンパ球がTリンパ球であり、抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる、

(9) 遺伝子の増幅を、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことなく、マイクロウェル中で行う。

本発明の第6の態様は、本発明の第5の態様である抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法、特に、抗原特異的リンパ球がBリンパ球であり、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子がクローニングされる方法によりクローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造する方法に関する。

本発明の第7の態様は、本発明の第5の態様である抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法、特に、抗原特異的リンパ球がTリンパ球であり、抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる方法によりクローニングされた抗原特異的T細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、細胞内Caイオンの濃度変化をCaイオン依存性の蛍光色素を用いることにより測定する方法の説明図である。特に、F1u03色素の細胞への導入と抗原特異的リンパ球の検出法について説明する。

図2は、蛍光色素を用いる方法におけるマイクロウェルアレイチップへの細胞の分注、抗原刺激、取り出しまでについての説明図である。特に、F1u03色素を導入した細胞のマイクロウェルへの分注について説明する。

図 3 は、従来の抗原特異的リンパ球測定に用いられている 96 穴プレートである。

図 4 は、蛍光顕微鏡またはマイクロアレイスキャナーを用いての細胞のマイクロウェルへの導入効率の試験結果である。

図 5 は、抗原特異的 B リンパ球のマイクロアレイスキャナーによる検出結果である。

図 6 は、図 5 に示す枠に囲まれた 25(5×5) 個の細胞についての蛍光強度のプロットである。

図 7 は、抗原刺激後に蛍光のシグナルが増強した細胞（抗原特異的 B リンパ球）の頻度を示す。

図 8 は、抗原特異的 B リンパ球からの抗体遺伝子の P C R による増幅についての説明図である。

図 9 は、実施例において得られた抗体 (L鎖) 遺伝子の配列と既存のデータベースに入っている抗体遺伝子の配列との比較を示す。

図 10 は、実施例において得られた抗体 (H鎖) 遺伝子の配列と既存のデータベースに入っている抗体遺伝子の配列との比較を示す。

発明を実施するための最良の形態

[マイクロウェルアレイチップ]

本発明のマイクロウェルアレイチップは、複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに 1 個の被検体リンパ球を格納し、抗原特異的リンパ球を 1 個単位で検出するために用いられるマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルは、1 つのマイクロウェ

ルに1つのリンパ球のみが格納される形状及び寸法を有する。

マイクロウェルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウェルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、直方体、逆円錐形、逆角錐形（逆三角錐形、逆四角錐形、逆五角錐形、逆六角錐形、七角以上の逆多角錐形）等であることもでき、これらの形状の二つ以上を組み合わせた形状であることもできる。例えば、一部が円筒形であり、残りが逆円錐形であることができる。また、逆円錐形、逆角錐形の場合、底面がマイクロウェルの開口となるが、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状である（その場合、マイクロウェルの底部は平坦になる）こともできる。円筒形、直方体は、マイクロウェルの底部は通常、平坦であるが、曲面（凸面や凹面）とすることもできる。マイクロウェルの底部を曲面とすることができるのは、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状の場合も同様である。

マイクロウェルの形状や寸法は、マイクロウェルに格納されるべきリンパ球の種類（リンパ球の形状や寸法等）を考慮して、1つのマイクロウェルに1つのリンパ球が格納されるように、適宜決定される。

1つのマイクロウェルに1つのリンパ球が格納されるようにするためには、例えば、マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径の1~2倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範

囲であることが適當である。

また、マイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径の1~2倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適當である。

マイクロウェルが円筒形の場合、その寸法は、例えば、直径5~100 μm であることができ、リンパ球がBリンパ球の場合、好ましくは、直径は5~15 μm である。また、深さは、例えば、5~100 μm であることができ、リンパ球がBリンパ球の場合、好ましくは、深さは5~40 μm であることができる。但し、マイクロウェルの寸法は、上述のように、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径とのマイクロウェルの寸法の好適な比を考慮して適宜決定する。

1つのマイクロウェルアレイチップが有するマイクロウェルの数は、特に制限はないが、抗原特異的リンパ球の頻度が 10^6 個に1個から多い場合には約500個であるという観点から、1cm²当たり、例えば、2,000~1,000,000個の範囲であることができる。

本発明の抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップは、複数のマイクロウェルを有し、かつ各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことを特徴とする。マイクロウェルアレイチップは、上記の本発明のマイクロウェルアレイチップをそのまま用いることができる。

本発明の抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップは、各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことで、抗原特異的リンパ球を1個1個の細胞レベルで特定することが可能になる。即ち、本発明のマイクロウェルアレイチップを用いる抗原特異的リンパ球の検出方法では、マイクロウェルに含まれる被検体リンパ球が1個であることから、抗原に反応する被検体リンパ球を1個の細胞として特定できる。

その結果、検出された抗原特異的リンパ球を取り出して、抗原特異的抗体遺伝子やT細胞受容体遺伝子をクローニングすることが可能になる。例えば、抗原特異的抗体遺伝子がクローニングできると、それを用いて大量にヒト型モノクローナル抗体を生産することができる。この抗体を感染症などの患者へ投与することにより、感染症などの治療、予防に用いることができると考えられる。

但し、同一のマイクロウェルには、リンパ球以外の細胞が被検体リンパ球とともに含まれていても良い。リンパ球以外の細胞であれば、抗原に反応せず、検出されることもないからである。

マイクロウェルには、被検体リンパ球は、例えば、培養液とともに格納される。培養液としては、例えば、以下のいずれかのものを挙げることができる。

1. 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mg/ml グルコース, 1mg/ml BSA, 20mM HEPES (pH7.4)
2. 10% FCS(牛胎仔血清)含有 RPMI1640 培地
3. 1mg/ml BSA 含有 RPMI1640 培地
4. 10% FCS(牛胎仔血清)含有 Dulbecco's MEM 培地
5. 1mg/ml BSA 含有 Dulbecco's MEM 培地

被検体リンパ球は血液由来であることができ、例えば、Bリンパ球またはTリンパ球であることができる。それ以外に扁桃腺(リンパ節)、脾臓等のリンパ組織由来リンパ球、がん浸潤リンパ球などの病変部位浸潤リンパ球等を挙げることができる。

[抗原特異的リンパ球の検出方法]

本発明の抗原特異的リンパ球の検出方法は、上記本発明のマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、リンパ球を刺激し、抗原に反応するリンパ球を検出することを含む。

各マイクロウェルへの抗原の添加は、以下のように行うことができる。

1. ピペットを用いてマイクロウェルアレイチップ全面を覆うように抗原液を添加する。
2. 1ウェルずつ自動スポットターを用いて抗原液を添加する。

本発明の抗原特異的リンパ球の検出方法により検出される抗原には、特に制限はないが、例えば、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、糖鎖、または有機高分子化合物(例えば、環境ホルモン)等であることができる。あるいは、細菌、ウィルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲン等であることができる。

細胞の培養は、例えば、リンパ球を培養液に懸濁させ、マイクロウェルに分注後、室温あるいは37°Cにて、空気中あるいはCO₂インキュベータ内にて培養することで行うことができる。

抗原に反応する細胞の検出は、例えば、(1)Caイオン依存性蛍光色素を用いて行う、(2)抗原により刺激され活性化した被検体リンパ球細胞の表面に発現する活性化マーカータンパク質を指標として行う、(3)被検体リンパ球細胞内蛍光物質が発する蛍光の偏光度を指標として行う、または(4)被検体リンパ球細胞の増殖または抗体産生を指標として行うことができる。

より具体的には、例えば、Bリンパ球の抗原受容体(免疫グロブリン)に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、抗体産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。あるいは、例えば、Tリンパ球の抗原受容体に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに

続いて細胞増殖、サイトカイン産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、サイトカイン産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。

細胞内シグナル伝達を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞内 Ca イオンの濃度変化を Ca イオン依存性の蛍光色素を用いることにより行うことができる。

細胞内 Ca イオン濃度変化は、蛍光色素として Fura-2、Fluo-3 あるいは Fluo-4 を用い、検出装置として蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイスキャナーを用いる。

具体的には、図 1 に示すように、B リンパ球に Ca イオン依存性蛍光色素である Fura-2 あるいは Fluo-3 を導入する。次いで抗原で B リンパ球を刺激すると、B リンパ球内 Ca イオン濃度が上昇する。その結果、Ca イオンが Ca イオン依存性蛍光色素に結合し、蛍光強度が増強される。Ca イオン濃度が低いと青っぽい色、高いと赤っぽい色で示されている。この方法では、抗原で刺激されることにより細胞内 Ca イオンが上昇した B リンパ球（抗原特異的）をマイクロウェルアレイチップを用いて検出できる。

細胞増殖を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞数を、生細胞特異的蛍光色素を用いて計測することによっても行うことができる。この方法は、具体的には、抗原で B リンパ球

を刺激し CO_2 インキュベータ内にて 37°C、3 日間培養すると、細胞が増殖する。細胞が増殖後、培養液中にフルオレッセイン・ジアセテート (Fluorescein diacetate (FDA)) あるいはカルボキシ・フルオレッセイン・ジアセテート・サクシンimidyl・エステル (Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)) 溶液を加える。これらの試薬は生細胞の膜を透過し、細胞内でエステラーゼによって分解され、膜不透過性の蛍光色素を生成する。この蛍光色素の発光は細胞数に比例するためウェル内の生細胞が発光する蛍光強度の和を蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイスキャナーを用いて計測することにより生細胞数を測定することができる。

抗体産生を計測することによっても、抗原に反応する細胞の検出を行うことができる。抗体産生は抗体を免疫化学的に計測することにより検出できる。

具体的には、抗原で B リンパ球を刺激し CO_2 インキュベータ内にて 37°C、1 週間培養すると、抗体が培養液中に分泌される。培養液中に分泌された抗原特異的抗体を ELISA 法 (酵素標識免疫吸着法) により検出する。

あるいは、マイトゲン、レクチン、抗体、サイトカイン、PMA、Ca イオノフォアを用いても、シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を検出することができる。

以下に、蛍光色素を用いる方法におけるマイクロウェルアレイチッ

プへの細胞の分注、抗原刺激、取り出しまでについて図2に基づいて説明する。

(1) 細胞の分注

マイクロウェル1つずつに細胞を入れる。

マイクロウェルに入る細胞は、例えば、末梢血からリンパ球画分を分離後、Bリンパ球画分をさらに分離精製して得られる。

次に、Fluo3/AM($2 \mu M$)溶液に細胞を懸濁させ、室温に30分置き、さらに緩衝液で細胞を洗浄し、細胞内に負荷されなかった色素を除去する。

色素を除去した細胞をマイクロウェルに分注する。

マイクロウェルアレイチップの両側にシールを貼り、その上にカバーグラスを乗せ、緩衝液を満たすことで、乾燥を防ぐ。

(2) 蛍光測定

まず、未刺激の細胞の蛍光を測定する。その際の蛍光強度(A)を測定する。

次いで抗原溶液をスライドグラスとカバーグラスの隙間に流し入れ緩衝液と交換し、抗原による刺激を受けた細胞の蛍光を測定する。刺激後1～2分後の蛍光強度(B)を測定する。刺激前後の蛍光強度比(B/A)の高いウェルの細胞を選別する。

(3) 抗原刺激に反応した細胞の取り出し(回収)

スライドグラスとカバーグラスの隙間に空気を入れると、カバーグ

ラスは容易に剥がれる。抗原刺激により反応した細胞を、未刺激の細胞の蛍光強度と抗原による刺激を受けた細胞の蛍光強度の比(B/A)により選別し、取り出すことで、抗原特異的リンパ球を回収することができる。

[抗原特異的抗原受容体遺伝子のクローニング方法]

本発明のクローニング方法は、ある抗原に特異的に反応するリンパ球（抗原特異的リンパ球）を1個選択し、次いでこの1個の抗原特異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子をクローニングする方法である。

本発明のクローニング方法は、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下である場合に特に有効である。

しかし、頻度が0.1%を超える場合にも適用できることは勿論である。

抗原特異的リンパ球は、例えば、Bリンパ球またはTリンパ球であることができる。さらに、抗原特異的抗原受容体遺伝子は、抗原特異的リンパ球がBリンパ球である場合には免疫グロブリン遺伝子であり、Tリンパ球である場合にはT細胞受容体遺伝子である。

血液中のリンパ球は1個1個がそれぞれ別々の抗原に反応する。そこで、本発明では、例えば、抗原に特異的に反応したBリンパ球を検出し、このBリンパ球から、抗原（病原体）に反応する免疫グロブリン（抗体）遺伝子をR T - P C Rにより増幅できる。同様に、抗原に

特異的に反応したTリンパ球を検出し、このTリンパ球から、抗原（病原体）に反応するT細胞受容体遺伝子をR T – P C Rにより増幅できる。

[抗原特異的リンパ球の選択]

1個の抗原特異的リンパ球の選択は、例えば、マイクロウェルアレイチップを用いた方法により行うことができる。マイクロウェルアレイチップを用いた方法では、例えば、1個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次いで、抗原に反応したリンパ球を検出し、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより、1個の抗原特異的リンパ球を得ることができる。この方法について、より具体的に説明する。

(マイクロウェルアレイチップ)

マイクロウェルアレイチップとしては、複数のマイクロウェルを有し、かつ各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことができるものを使用することができる。各マイクロウェルが被検体リンパ球を1個含むことで、抗原特異的リンパ球を細胞レベルで特定することができる。即ち、このマイクロウェルアレイチップを用いると、マイクロウェルに含まれる被検体リンパ球が1個であることから、抗原に反応する被検体リンパ球を1個の細胞として特定でき、結果として、抗原特異的リンパ球を1個の細胞として検出できる。そして、検出さ

れた1個の抗原特異的リンパ球を取り出して、遺伝子をクローニングする。

但し、同一のマイクロウェルには、リンパ球以外の細胞が被検体リンパ球とともに含まれていても良い。リンパ球以外の細胞であれば、抗原に反応せず、検出されることもないからである。

マイクロウェルアレイチップとしては、上記本発明のマイクロウェルアレイチップを挙げることができる。

マイクロウェルには、被検体リンパ球は培養液とともに格納されている。培養液としては、例えば、以下のものを挙げることができる。

1. 137mM NaCl, 2.7 mM KC1, 1.8mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mg/ml グルコース, 1mg/ml BSA; 20mM HEPES (pH7.4)
2. 10% FCS(牛胎仔血清)含有 RPMI1640 培地
3. 1mg/ml BSA 含有 RPMI1640 培地
4. 10% FCS(牛胎仔血清)含有 Dulbecco's MEM 培地
5. 1mg/ml BSA 含有 Dulbecco's MEM 培地

被検体リンパ球は血液由来であることができ、例えば、Bリンパ球またはTリンパ球であることができる。それ以外に扁桃腺(リンパ節)、脾臓等のリンパ組織由来リンパ球、がん浸潤リンパ球などの病変部位浸潤リンパ球等を挙げることができる。

(抗原特異的リンパ球の検出方法)

抗原特異的リンパ球の検出方法は、上記マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、細胞を刺激し、抗原に反応する細胞を検出することを含む。

各マイクロウェルへの抗原の添加は、以下のように行うことができる。

1. ピペットを用いてマイクロウェルアレイチップ全面を覆うように抗原液を添加する。
2. 1 ウェルずつ自動スポットターを用いて抗原液を添加する。

この方法により検出される抗原には、特に制限はないが、例えば、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、糖鎖または有機化合物等であることができる。また、抗原は、細菌、ウィルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲン等であることができる。

細胞の培養は、例えば、リンパ球を培養液に懸濁させ、ウェルに分注後、室温あるいは37°Cにて、空気中あるいはCO₂インキュベータ内にて培養することで行うことができる。

抗原に反応する細胞の検出は、以下のように行うことができる。

例えば、Bリンパ球の抗原受容体（免疫グロブリン）に抗原が結合

するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、抗体産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。あるいは、例えば、Tリンパ球の抗原受容体に抗原が結合するとまず細胞内シグナル伝達が起こり、それに続いて細胞増殖、サイトカイン産生が起こる。従って、細胞内シグナル伝達、細胞増殖、サイトカイン産生を種々の方法により検知することにより、抗原に反応する細胞を検出することができる。

細胞内シグナル伝達を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞内Caイオンの濃度変化をCaイオン依存性の蛍光色素を用いることにより行うことができる。

細胞内Caイオン濃度変化は、蛍光色素としてFura-2あるいはFluo-3を用い、検出装置として蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイスキャナーを用いる。

具体的には、図1に示すように、Bリンパ球にCaイオン依存性蛍光色素であるFura-2あるいはFluo-3を導入する。次いで抗原でBリンパ球を刺激すると、細胞内Caイオン濃度が上昇する。その結果、CaイオンがCaイオン依存性蛍光色素に結合し、蛍光強度が増強される。Caイオン濃度が低いと青っぽい色、高いと赤っぽい色で示されている。この方法では、抗原で刺激されることにより細胞内Caイオンが上昇したBリンパ球（抗原特異的）を、マイクロウ

エルアレイチップを用いて検出できる。

細胞増殖を検出することによる、抗原に反応する細胞の検出は、例えば、細胞数を、生細胞特異的蛍光色素を用いて計測することによっても行うことができる。この方法は、具体的には、抗原でBリンパ球を刺激しCO₂インキュベータ内にて37°C、3日間培養すると、細胞が増殖する。細胞が増殖後、培養液中にフルオレッセイン・ジアセテート(Fluorescein diacetate(FDA))あるいはカルボキシ・フルオレッセイン・ジアセテート・スクシンイミジル・エステル(Carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester(CFSE))溶液を加える。これらの試薬は生細胞の膜を透過し、細胞内でエステラーゼによって分解され、膜不透過性の蛍光色素を生成する。この蛍光色素の発光は細胞数に比例するためウェル内の生細胞が発光する蛍光強度の和を蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイスキャナーを用いて計測することにより生細胞数を測定する。

抗体産生を計測することによっても、抗原に反応する細胞の検出を行うことができる。抗体産生は抗体を免疫化学的に計測することにより検出できる。

具体的には、抗原でBリンパ球を刺激しCO₂インキュベータ内にて37°C、1週間培養すると、抗体が培養液中に分泌される。培養液中に分泌された抗原特異的抗体をELISA法(酵素標識免疫吸着法)により検出する。

尚、この検出方法では、マイトゲン、レクチン、抗体、サイトカイン、PMA、Caイオノフォアを用いても、シグナル伝達、細胞増殖、抗体産生を検出することができる。

以下に、蛍光色素を用いる方法におけるマイクロウェルアレイチップへの細胞の分注、抗原刺激、取り出しまでについて図2に基づいて説明する。

(1) 細胞の分注

ウェル1つずつに細胞を入れる。

ウェルに入れる細胞は、末梢血からリンパ球画分を分離後、Bリンパ球画分をさらに分離精製して得られる。

次に、Fluo3/AM($2\mu M$)溶液に細胞を懸濁させ、室温に30分置き、さらに緩衝液で細胞を洗浄し、細胞内に負荷されなかった色素を除去する。

色素を除去した細胞をマイクロウェルに分注する。

マイクロウェルアレイチップの両側にシールを貼り、その上にカバーグラスを乗せ、緩衝液を満たすことで、乾燥を防ぐ。

(2) 蛍光測定

まず、未刺激の細胞の蛍光を測定する。その際の蛍光強度(A)を測定する。

次いで抗原溶液をスライドグラスとカバーグラスの隙間に流し入れ緩衝液と交換し、抗原による刺激を受けた細胞の蛍光を測定する。刺

激後 1 ~ 2 分後の蛍光強度 (B) を測定する。刺激前後の蛍光強度比 (B / A) の高いウェルの細胞を選別する。

(3) 抗原刺激に反応した細胞の取り出し

スライドグラスとカバーグラスの隙間に空気を入れると、カバーグラスは容易に剥がれる。抗原刺激により反応した細胞を、未刺激の細胞の蛍光強度と抗原による刺激を受けた細胞の蛍光強度の比 (B / A) により選別し、取り出す。

但し、選別(検出)された抗原特異的リンパ球は、マイクロウェルから取り出すことなく、そのままマイクロウェル中で行う、次の遺伝子増幅に供することもできる。

(遺伝子増幅)

取り出された抗原特異的リンパ球は、細胞溶解剤を用いて溶解した後、R T - P C R を用いて、抗原特異的リンパ球が B リンパ球であれば抗原特異的免疫グロブリン (抗体) 遺伝子がクローニングされ、抗原特異的リンパ球が T リンパ球であれば抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子がクローニングされる。

細胞溶解剤としては、公知の物をそのまま使用でき、例えば、以下のものを挙げることができる。

1x 1st strand buffer [GIBCO-BRL, SuperScriptII に添付されている] , 0.2 mM dNTP, 0.25% NP-40, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM DTT, Random Primer 0.05 μ M, 1U/ μ L RNasin

Bリンパ球における抗原受容体遺伝子は抗体遺伝子と同一のものであり、タンパク質としては免疫グロブリンと呼ばれる。抗原受容体はBリンパ球の膜表面に存在し（膜型免疫グロブリン）、抗体は普通分泌蛋白（分泌型免疫グロブリン）として產生される。その違いはタンパク質のC末端側にある。膜型免疫グロブリンは細胞膜に埋もれる膜ドメインおよび細胞質側につきでる部分を持っている。分泌型免疫グロブリンも同じ遺伝子から產生される。しかし、オルタナティブ・スプライシング（alternative splicing）によりタンパク質のC末端側が膜型免疫グロブリンと異なり膜ドメインを持たない。その結果、分泌蛋白として產生される。しかし、この二つの蛋白の抗原結合部位は同一である。したがって、Bリンパ球の場合、抗体遺伝子のクローニングと抗原受容体遺伝子のクローニングは同じである。

Tリンパ球の場合は、抗原受容体の分泌型というものはない。従って、抗原受容体遺伝子をクローニングすることになる。Tリンパ球の場合にはBリンパ球で設計したプライマーと同じ考え方でプライマーを設計する。これは、Tリンパ球の抗原受容体（T C R）の遺伝子構成はBリンパ球の免疫グロブリン遺伝子の遺伝子構成とほとんど同じだからである。そのため、同じ考え方でプライマーを設計することができる。したがって、抗体遺伝子がクローニングできれば、ほとんど同じ方法でT C R遺伝子もクローニングすることができる。

以下、抗原特異的免疫グロブリン遺伝子の増幅を例にさらに説明する。

取り出された抗原特異的リンパ球を細胞溶解剤で溶解して得られた溶液を用い、逆転写酵素によるcDNAの調製を行う。次いで、免疫グロブリン遺伝子用のプライマーミックスを用いて2回PCRすることにより、所望の抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を増幅（クローニング）することができる。

逆転写酵素によるcDNAの調製は、常法（例えば、Sambrook J, Russell DW in Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001)）により行うことができる。

本発明では細胞から抽出・精製したRNAを用いてRT反応をするのではなく、細胞溶解液を用いて直接RT反応を行うことが適当である。

（PCR法による抗体遺伝子の増幅）

PCR法による抗体遺伝子の増幅では、PCR反応を2回実施することにより抗体遺伝子のV領域遺伝子を増幅することが適当である。

抗体分子はH鎖およびL鎖の組合せによりできており、ヒト抗体遺伝子のH鎖は生殖細胞系列では約200種類のV領域遺伝子断片、約20種類のD断片、6種類のJ断片より構成されており、Bリンパ球に分化するときに遺伝子再構成により各々1種類のV断片、D断片、J断片が

組み合わさることにより（V/D/J再構成）ひとつの抗原結合部位を形成する。L鎖も同様である。

各Bリンパ球は細胞表面に1種類の抗体分子を発現している。抗原特異的Bリンパ球より抗原特異的抗体遺伝子を増幅するためにはそれぞれのV断片の配列に一致したプライマーを用いる必要がある。

抗体分子はH鎖、L鎖それぞれ2本ずつのペプチド鎖からなり、図8に示す構造図の左側のV領域（H鎖はV_H領域、L鎖はV_κあるいはV_λ領域）で抗原と結合する。H鎖及びL鎖のサブファミリーの数を以下の表に示す。

表 1

		V領域	C領域
H鎖		7種類	9種類*
L鎖	κ鎖	7種類	1種類
	λ鎖	11種類	7種類**

上記表1に示すように、ヒト抗体遺伝子のH鎖のV領域は7種類のサブファミリーに分類される。サブファミリー内のV断片の配列はよく似ているので共通したプライマーを設定することが可能である。（*C_H領域にはC_γ1～4、C_μ、C_δ、C_α1～2、C_εがあるが、このうち血清中の抗体の主な種類であるIgG、IgMについてプライマーを設計し、PCRに用いた。C_γ1～4については共通配列1種類を用いているた

めに $C\mu$ と合わせて 2 種類のプライマーを用いている。** $C\lambda$ 鎖には $C\lambda 1 \sim C\lambda 7$ 鎖があるが、プライマーとしては共通配列の 1 種類を用いている。)

L 鎖の V 領域および C 領域の各サブファミリーについても同様のことが言えるので、各サブファミリー毎にプライマーを設定し、PCR 反応には、 H 鎖あるいは L 鎖の全サブファミリーに対するプライマーをミックスしたプライマーミックスを用いる。即ち、プライマーとしては、 H 鎖、 L 鎖それぞれの全種類のミックスを用いる。

以下のように PCR 反応を 2 回行い、抗体遺伝子を増幅する。

H 鎖及び L 鎖の V 領域のアミノ酸数が 110 ~ 120 前後であることから、 V 領域の遺伝子は、約 400 bp 程度である。

そこで、図 8 に示すように、1 回目の PCR 反応である PCR 1 では、リーダーシークエンス (L) から C 領域の cDNA が増幅される。

2 回目の PCR 反応である PCR 2 では、PCR 1 の内側 (V 領域の始まりから C 領域の始まり) 約 400 bp の cDNA が増幅される。

そして、2 回目の PCR 反応で増幅した cDNA の配列を分析する。

この点に関して、さらに説明する。

本発明において、PCR 1 と PCR 2 とでは、異なる配列のプライマーミックスを用いるのは、以下の理由による。PCR 1 で増幅したものを再度 PCR 2 で増幅するが、PCR 1 の産物は特異的なものばかりでなく、非特異的な増幅産物も含まれている。PCR 2 を同じプ

ライマーで増幅すると特異的なDNA配列も増幅するが、非特異的な配列も増幅してしまう。そこで、PCR2ではPCR1で増幅するDNA配列でPCR1のプライマーの位置より少し内側の配列をプライマーに用いる。そうすることで、PCR1で増幅した非特異的なDNA配列は増幅せずに、特異的なDNA配列を増幅できるようになる。尚、このように、特異的なDNA配列を増幅するためにプライマーを変えて2回目のPCR2を行うという以外に、1個のBリンパ球から抗体遺伝子を増幅する場合、1回のPCRでは増幅が量的に不十分であるという理由からも、PCR反応を2回行うことが適当である。

上記方法では、2回目のPCR反応で増幅したcDNAの配列を分析するが、その際、1回目のPCR反応生成物と2回目のPCR反応生成物とは、分離する必要はない。これは、通常、PCR1の産物はPCR2で増幅した産物に較べると無視できる量だからである。

抗原特異的リンパ球がTリンパ球である場合には抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされるが、クローニング方法は、上記Bリンパ球の場合と同様に行うことができる。Tリンパ球の抗原受容体（TCR）のサブファミリーを以下の表に示す。

表 2

	V 領域	C 領域
α 鎖	41 種	1 種
β 鎖	30 種	2 種

本発明のクローニング方法では、抗原特異的リンパ球が B リンパ球である場合、抗原特異的免疫グロブリン（抗体）遺伝子がクローニングされる。そしてクローニングされた遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造することができる。クローニングされた遺伝子を用いてのモノクローナル抗体の製造は常法により行うことができ、P C R 法で増幅した V 領域の c D N A と C 領域の遺伝子配列を結合し、発現ベクターを用いて抗体分子を作成する。

モノクローナル抗体の製造は、例えば、Kanda H, Mori K, Koga H, Taniguchi K, Kobayashi H, Sakahara H, Konishi J, Endo K, Watanabe T. Construction and expression of chimeric antibodies by a simple replacement of heavy and light chain V genes into a single cassette vector. 13:359-366, 1994 に記載の方法により行うことができる。

尚、本発明の方法においては、抗体分子全体を製造する必要はなく、V 領域が得られれば良い。また、上記 P C R 法で得られる遺伝子配列は V 領域と C 領域の一部である。そこで、モノクローナル抗体の製造方法において発現ベクターに導入する遺伝子は、抗体分子（全体）ではなく、V 領域のみまたは V 領域 + C 領域の一部であってもよい。

H鎖とL鎖とは、通常は、別々にクローニングする。この場合、RTまでは1本のチューブで反応を行い、以後のPCRではH鎖用とL鎖用の2本のチューブを用いる。H鎖とL鎖を1本のチューブで合成できることもあるが、増幅しやすい方が主に増えてしまうということがしばしば起こるので、確実にH鎖、L鎖を増幅させるという意味から2本のチューブで別々にPCRを行うことが好ましい。

抗体を得るには、H鎖とL鎖を両方とも発現させる必要があり、上記発現ベクターにはH鎖とL鎖の両方を入れておく。

その場合、H鎖とL鎖を別々の発現ベクターに挿入し、蛋白を発現させる際に、同じ細胞に両方の発現ベクターを同時に導入することにより、1個の細胞でH鎖とL鎖を発現させるという方法、および、H鎖とL鎖を1つのベクターに同時に挿入した発現ベクターを構築し、それを細胞に導入することにより、H鎖とL鎖を一つの細胞で発現させるという2通りがある。

動物細胞に発現ベクターを導入した場合は、產生された抗体はヒトあるいはほ乳類の体の中で作られる抗体と全く同じものになる。大腸菌で作らせた場合は、アミノ酸の配列は上記のものと全く同じだが、糖鎖が結合していないものが作られる。本発明の方法では、產生された抗体がヒトあるいはほ乳類の体の中で作られる抗体と全く同じものになることから、動物細胞で抗体を產生させることが好ましい。

本発明のクローニング方法は、抗原特異的リンパ球がTリンパ球である場合、抗原特異的T細胞受容体遺伝子がクローニングされる。クローニングされた抗原特異的受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療を行うことができる。例えば、クローニングしたT細胞受容体遺伝子をTリンパ球あるいはTリンパ球前駆細胞に導入してやることにより、病原体等に特異的なT細胞受容体を発現したTリンパ球を人為的に作り出すことができる。このようにして作り出したTリンパ球を免疫機能の低下した患者に投与することにより免疫機能を回復させることが可能となる。

実施例

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

実施例 1

1. Bリンパ球の分離

末梢血からFicoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いてリンパ球画分を分離し、さらにAutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてリンパ球画分からBリンパ球画分をさらに分離精製した。

2. Fluo3の細胞への導入（図1参照）

2×10^6 個のBリンパ球を $2 \mu M$ Fluo3/AM（同仁、熊本）/RPMI1640/10% FCS溶液に懸濁し、室温に30分インキュベーションする。RPMI1640/10% FCS

溶液で細胞を洗浄し、細胞内に導入されなかったFluo3/AMを除いた。その後、細胞をRPMI1640/10% FCS溶液に懸濁した。

3. マイクロウェルアレイチップ（図2参照）

マイクロウェルアレイチップはpoly(dimethylsiloxane) (PDMS) を用いて作製されており、直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ $32\text{ }\mu\text{m}$ のマイクロウェルが $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ のチップ上に縦・横 $30\text{ }\mu\text{m}$ の間隔（マイクロウェルの中心から中心までの距離は $40\text{ }\mu\text{m}$ ）で配置されている。マイクロウェルアレイチップの両側には厚さ 1 mm 幅約 1 mm 長さ 2 cm のシールを貼った。

4. マイクロアレイスキャナー

本装置は基本的に日立ソフトウェアエンジニアリング（株）（横浜市）のマイクロアレイスキャナー（CRBIO IIe-FITC）を用いており、以下の変更を加えている。

（1）搭載されているレーザー（Cy3用、 532 nm ； Cy5用、 635 nm ）のうちの1本を 473 nm のレーザーと置換してある。

（2）焦点深度も従来のものは $\pm 25\text{ }\mu\text{m}$ であるが、本装置は $\pm 50\text{ }\mu\text{m}$ に変更してある。

5. マイクロウェルアレイチップを用いた活性化Bリンパ球の検出（図2参照）

上記マイクロウェルアレイチップに上記細胞懸濁液を添加し、5分間静置した。マイクロウェルに入らなかった細胞をRPMI1640/10% FCS溶液を

用いて洗い流した。リンパ球の直径は約 $8\text{ }\mu\text{m}$ ($8\text{ }\mu\text{m}\pm1\text{ }\mu\text{m}$)であり、使用するマイクロウェルの直径が $10\text{ }\mu\text{m}$ であるためにひとつのマイクロウェルにはリンパ球は1個入る。カバーグラスを上記シールの上に置き、チップとカバーグラスの間にRPMI1640/10% FCS溶液を満たした。このマイクロウェルアレイチップをマイクロアレイスキャナーに挿入し、解像度 $10\text{ }\mu\text{m}$ でスキャンし、データを保存した(抗原刺激前の蛍光のデータ:A)。

次に、チップとカバーグラスの間のRPMI1640/10% FCS溶液を除き、そこへRPMI1640/10% FCS溶液に溶解させた抗原($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)を加えた。抗原を加えて1分後にマイクロウェルアレイチップをマイクロアレイスキャナーに挿入し、解像度 $10\text{ }\mu\text{m}$ でスキャンし、データを保存した(抗原刺激後の蛍光のデータ:B)。

刺激前後の蛍光強度の比(B/A)を計算し、比の大きいウェルを特定した。このウェルの中に抗原特異的Bリンパ球が存在した。

実施例 2

蛍光顕微鏡あるいはマイクロアレイスキャナーを用いて細胞のマイクロウェルへの導入の効率を調べた。

CellTracker Orange (Molecular Probe社) を用いてマウスリンパ球を蛍光標識した。

マウスリンパ球は、以下のように入手した。

マウスより脾臓を摘出し、PBSが入ったプラスチックシャーレに移し

た。脾臓を2枚のメッシュの間に挟み、すりつぶすことによりリンパ球を脾臓より取り出す。取り出したリンパ球は RPMI1640, 10% FCS 溶液に懸濁し、リンパ球の数を数えた。

マウスリンパ球の蛍光標識は、以下のように行った。

2×10^6 個の B リンパ球を $1 \mu M$ CellTracker Orange (Molecular Probes, USA)、0.02% Pluronic F-127 (Molecular Probes, USA) を含む Loading Buffer (20 mM HEPES, pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml Glucose, 1 mg/ml BSA) に懸濁し、室温で振盪しながら30分インキュベーションした。RPMI1640/10% FCS溶液で細胞を洗浄し、細胞内に導入されなかったCellTracker Orangeを除いた。その後細胞をRPMI1640/10% FCS溶液に懸濁した。

蛍光標識したマウスリンパ球 (10^5 個/ μL) の細胞懸濁液 ($100 \mu L$) を、マイクロウェルアレイを覆うように加え、細胞を播種した。

ここで使用したマイクロウェルアレイの形状や寸法等は、以下の通りである。

直径 $10 \mu m$ 、深さ $12 \mu m$ のマイクロウェルが $2 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$ のチップ上に縦・横 $15 \mu m$ の間隔 (マイクロウェルの中心から中心までの距離は $25 \mu m$) で配置されている。マイクロウェルアレイチップの両側には厚さ 1 mm 幅約 1 mm 長さ 2 cm のシールを貼った。

細胞がウェル内に沈むのを待ったあと、ピペット操作によりウェル

外の細胞を洗い流した。この細胞播種、洗浄の一連の操作を数回繰り返すことでより多くのウェルに細胞を入れることができる。最後にバッファー (RPMI1640/10% FCS 溶液) で洗浄しウェル外に細胞が残らないようにした。カバーガラスをかぶせ、乾燥を防ぐと同時に液面を均一にして読み取りの精度を高めた。これを蛍光顕微鏡 (BX-URA2/BX51W、オリンパス光学工業、日本) 下で観察し、またマイクロアレイスキャナー (CRB10 IIe-FITC、日立ソフトウェアエンジニアリング、日本) に挿入し蛍光を読みとった。結果を図 4 に示す。

リンパ球の直径は約 $8 \mu\text{m}$ であり、使用したマイクロウェルの直径が $10 \mu\text{m}$ であるために、ひとつのマイクロウェルにはリンパ球は 1 個入る。図 4 では、チップの一部である 1 クラスター (30×30) を示す。左図は蛍光顕微鏡で観察した結果であり、約 85% のウェルに細胞が入っていることが確認された。右図は別のサンプルをマイクロアレイスキャナーで観察した結果であり、約 99% のウェルに細胞が入っていることが確認された。

実施例 3

〔抗原特異的 B リンパ球のマイクロアレイスキャナーによる検出〕

健常人に B 型肝炎ウィルスワクチンを接種し、常法により、4 日目あるいは 6 日目に末梢血より B リンパ球を調製した。ヒト B リンパ球をカルシウム蛍光指示薬 Fluo-4/AM (Molecular Probes 社) $4 \mu\text{M}$, CellTracker Orange (Molecular Probes 社) $1 \mu\text{M}$, Pluronic

F-127 (Molecular Probes 社) 0.02%を含むバッファー (Loading Buffer (20mM HEPES, pH7.4, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8mM CaCl₂·2H₂O, 1mM MgCl₂, 1mg/mL glucose, 1mg/mL BSA)) に懸濁することにより、Fluo-4 および CellTracker Orange を細胞質内に導入した。Fluo-4 および CellTracker Orange を負荷した B リンパ球を実施例 2 と同様のマイクロウェルアレイチップに実施例 2 と同様の方法で播種した。

その後、マイクロウェルアレイチップに播種した Fluo-4 および CellTracker Orange を負荷した B リンパ球に、B 型肝炎ウィルス抗原 HBs タンパクによる刺激を与え、刺激前後での B リンパ球の蛍光をマイクロウェルアレイキャナーで観察した。結果を図 5 に示す。

B 型肝炎ウィルス抗原 HBs タンパクによる刺激は、以下のようにして与えた。

マイクロアレイスキャナーより取り出したマイクロウェルアレイチップから RPMI1640/10% FCS 溶液をチップにより抜き取り、かわりに RPMI1640/10% FCS 溶液に 100 μg/mL になるように希釀溶解した B 型肝炎ウィルス抗原 HBs タンパクを添加し、再びマイクロアレイスキャナーに挿入し、約 1 分後に解像度 2.5 μm でスキャンした。

図 5 の左図はリンパ球を刺激する前の蛍光画像である。Fluo-4 を導入したリンパ球がわずかな蛍光を発しているため画像では淡い水色を示すが、蛍光強度はかなり低かった。

一方、右図はリンパ球を抗原（B型肝炎ウィルス抗原 HBs タンパク 100 μ g/mL）で刺激した後の蛍光画像である。大部分のリンパ球では、蛍光強度に変化はない。しかし、抗原特異的 B リンパ球（矢印の部分）の蛍光が増加し、画像では赤色を示している。

さらに、CellTracker Orange の蛍光を観察することにより、刺激前後で各ウェルに細胞が 1 個ずつ入っており、刺激前後で細胞のウェル間の移動がないことを確認している（データなし）。

図 5 に示す枠に囲まれた 25(5×5) 個の細胞について、それぞれの蛍光強度の測定値をプロットし、図 6 に示す。

抗原特異的 B リンパ球（矢印のポイント）の蛍光強度は刺激前およそ 77000(77454) であったが、刺激後およそ 350000(349242) になり、4.5 倍の増加を示した。それに対して、刺激に反応しない 24 個のリンパ球は刺激前平均 52000(51683.875)、刺激後平均 39000(38720.833)、平均 0.75 倍の変化であり、蛍光強度に有意な変化はみられない。

図 6 で、中央の直線（斜線）は刺激前後の蛍光強度が変化しない場合の蛍光強度を示しており、両側の 2 本の直線（斜線）は刺激前の蛍光強度に対して刺激後の蛍光強度が 4 倍（上側の直線）あるいは 1/4 倍（下側の直線）に増加した場合の蛍光強度を示している。抗原特異的 B リンパ球（矢印のポイント）の蛍光強度は、上側の直線のやや上に位置している。ひとつのマイクロウェルにはリンパ球が 1 個入ってお

り、本方法で、B型肝炎ウィルス抗原 HBs タンパクで刺激された 1 個の抗原特異的 B リンパ球を検出できることが分かる。

実施例 4

[マイクロウェルアレイチップを用いた抗原特異的 B リンパ球の検出]
これまでに B 型肝炎ウィルスワクチンを接種することにより B 型肝炎ウィルスの HBs 抗原に対する抗体の力値が上昇していた健常人ボランティア (#1、#2) に常法により、B 型肝炎ウィルスのワクチン (HBs 抗原 10 μ g) を接種し、接種前および後 (4 日、 6 日、 8 日、 10 日後) の末梢血を採取し、リンパ球を分離、さらに B リンパ球を分離調製した。その B リンパ球を、実施例 3 と同様にして Fluo-4 (Molecular Probes 社) 4 μ M および CellTracker Orange (Molecular Probes 社) 1 μ M で標識後、マイクロウェルアレイチップに播種し、B 型肝炎ウィルス抗原 (HBs タンパク 100 μ g/mL) で刺激した。マイクロアレイスキャナーを用いて抗原刺激前後の細胞の蛍光を測定し、刺激前には Fluo-4 の蛍光のシグナルが弱く、刺激後に Fluo-4 の蛍光のシグナルが増強した細胞 (抗原特異的 B リンパ球) の数を計測した。次に、CellTracker Orange の蛍光を観察し、B リンパ球の総数を計測した。抗原に反応して Fluo-4 の蛍光が増加した細胞の数を B リンパ球の総数で割った頻度 (百分率) を計算してグラフに示した。結果を図 7 に示す。

刺激後に蛍光のシグナルが増強した細胞 (抗原特異的 B リンパ球) の数の計測は、以下のように行った。

マイクロアレイスキャナーを用いて抗原刺激前後の Fluo-4 および CellTracker Orange の蛍光画像を得る。これらを比較し、CellTracker Orange の蛍光シグナルにより、抗原刺激の前後で細胞の位置が移動していないもので、刺激前には Fluo-4 の蛍光シグナルが弱く青色で表示され、刺激後に Fluo-4 の蛍光シグナルが増強し赤色で表示される細胞を、シグナルが増強した細胞（抗原特異的 B リンパ球）として計数した。頻度を計算するために、任意に選んだ 5 クラスター（4500 ウェル）について、Fluo-4 の蛍光シグナルが増強した細胞（抗原特異的 B リンパ球）を数えた。また同じ 5 クラスター（4500 ウェル）に含まれる全細胞数を CellTracker Orange（Molecular Probe 社）の蛍光画像を用いて計測した。

図 7 に示す結果から以下のことことが分かる。

1. B 型肝炎ウィルスワクチンを接種することにより B 型肝炎ウィルスの HBs 抗原に対する抗体の力値が上昇していた健常人ボランティアの末梢血中の B 型肝炎ウィルス抗原特異的 B リンパ球は全 B リンパ球のわずか 1～2%である。
2. また、ワクチン接種後 4～6 日後をピークに全 B リンパ球に対する抗原特異的 B リンパ球の割合が上昇し、その後ワクチン接種前の割合にまで下がることが分かる。
3. このように本方法によりヒト末梢血中の抗原特異的 B リンパ球の有無、頻度およびその変化を検出することができる。

実施例 5

1. B リンパ球の分離

末梢血からFicoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いてリンパ球画分を分離し、さらにAutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてリンパ球画分からB リンパ球画分をさらに分離精製した。

2. F 1 u o 3 の細胞への導入（図1参照）

2×10^6 個のB リンパ球を $2 \mu M$ F 1 u o 3 /AM (同仁、熊本) /loading buffer (137mM NaCl, 2.7 mM KC1, 1.8mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1mg/mLグルコース, 1mg/mL BSA, 20mM HEPES (pH7.4))に懸濁し、室温に30分インキュベーションした。loading bufferで細胞を洗浄し、細胞内に導入されなかったF 1 u o 3 /AMを除く。その後細胞をRPMI1640/10% FCS 溶液に懸濁した。

3. マイクロウェルアレイチップ（図2参照）

マイクロウェルアレイチップはpoly(dimethylsiloxane) (PDMS) を用いて作製されており、直径 $10 \mu m$ 、深さ $32 \mu m$ のマイクロウェルが $2 cm \times 2 cm$ のチップ上に縦・横 $30 \mu m$ の間隔（マイクロウェルの中心から中心までの距離は $40 \mu m$ ）で配置されている。チップの両側には厚さ1mm幅約1mm長さ2cmのシールを貼った。

4. マイクロアレイスキャナー

本装置は基本的に日立ソフトウェアエンジニアリング（株）（横浜市）のマイクロアレイスキャナー（CRB10 IIe）を用いており、以下の変更を加えている。搭載されているレーザー（Cy3用，532 nm；Cy5用，635 nm）のうちの1本を473nmのレーザーと置換してある。

5. マイクロウェルアレイチップを用いた活性化Bリンパ球の検出（図2参照）

上記マイクロウェルアレイチップに上記細胞懸濁液を添加し、5分間静置する。マイクロウェルに入らなかった細胞をRPMI1640/10% FCS溶液を用いて洗い流した。リンパ球の直径は約8 μ mであり、使用するマイクロウェルの直径が10 μ mであるためにひとつのマイクロウェルにはリンパ球は1個入る。カバーグラスを上記シールの上に置き、チップとカバーグラスの間にRPMI1640/10% FCS溶液を満たした。このマイクロウェルアレイチップをマイクロアレイスキャナーに挿入し、解像度10 μ mでスキャンし、データを保存した（抗原刺激前の蛍光のデータ：A）。

次に、チップとカバーグラスの間のRPMI1640/10% FCS溶液を除き、そこへRPMI1640/10% FCS溶液に溶解させた抗原（10 μ g/mL）を加えた。抗原を加えて1分後にマイクロウェルアレイチップをマイクロアレイスキャナーに挿入し、解像度10 μ mでスキャンし、データを保存した（抗原刺激後の蛍光のデータ：B）。

刺激前後の蛍光強度の比（B/A）を計算し、比の大きいウェルを特定し

た。このウェルの中に抗原特異的Bリンパ球が存在した。

6. マイクロウェルからの細胞の分取。

マイクロマニピュレータを用いてガラスキャピラリーを用いることにより顕微鏡下で細胞を分取した。

7. 抗原特異的Bリンパ球からの抗体遺伝子のPCRによる増幅（図8参照）

1個の抗原特異的Bリンパ球をPCR用チューブに添加する（5 μ L）。細胞に15.15 μ Lの細胞溶解液（25 μ Lに希釀された時の最終濃度：1x 1st strand buffer [GIBCO-BRL, SuperScriptIIに添付されている]，0.2 mM dNTP, 0.25% NP-40, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM DTT, Random Primer 0.05 μ M, 1U/ μ L RNasin [Promega, Madison, WI]）を加え、そこへ逆転写酵素SuperScriptII (GIBCO-BRL, Rockville, MD) を（4.85 μ L, 50U）添加し37°C、1時間反応させmRNAよりcDNAを合成した。

RT-PCR反応

Cell sol. (1 cell)	5.0 μ L
1 st strand buffer (5x)	5.0
2.5 mM dNTP	2.0
2.5 % NP-40	2.5
1 mg/ml BSA	2.5
0.1M DTT	2.5

Random primer (50 pmol/ μ L)	0.025
RNase Inhibitor (RNasin 40U/ μ L)	0.625
<u>Super Script II</u>	<u>4.85(50U)</u>
Total	25.0 μ L

37°C 1 h

上記反応により 1 個のリンパ球の mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。

抗体遺伝子の増幅 :

ヒト抗体遺伝子の H鎖の V 領域は 7 種類のサブファミリーに分類される。サブファミリーの V 断片の配列はよく似ているので共通したプライマーを設定することが可能である。H鎖およびL鎖の各サブファミリーごとにプライマーを設定し、H鎖あるいはL鎖の全サブファミリーに対するプライマーをミックスしたものを用い、以下のように PCR 反応を 2 回行い、抗体遺伝子を増幅した。

PCR 1 の反応は、上記 cDNA 5 μ L を 15 μ L の PCR mix (最終濃度 : 1x TAKARA ExTaq buffer, 0.25 mM dNTP, 各サブファミリーに対する Primer 1 0.5 μ M, 0.05U/ μ L ExTaq [Takara, 京都]) に加え、94°C, 3 min; (94°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 sec) x 40 cycles; 72°C, 5 min; 10°C, ∞ 反応させた。

PCR 1

cDNA (上記 RT 反応液)	5.0 μ L
10x ExTaq buffer	2.0
2.5 mM dNTP	2.0
Primer 1 5' Mix (10 μ M each)	1.0
Primer 1 3' Mix (10 μ M each)	1.0
H ₂ O	7.0
<u>Takara ExTaq (0.5 U/μ L)</u>	<u>2.0</u>
Total	20.0 μ L

94 °C, 3 min.

94 °C, 30 sec; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1.5 min. 40 cycles

72 °C, 5 min.

10 °C

P C R 1 の反応により免疫グロブリン（抗体）遺伝子の Leader 配列から定常部（C）領域までの D N A 配列を増幅した。

以下に上記反応で用いたプライマー（H鎖用）の配列を示す。

Primer 1 5' Mix (各 10 μ M) (V領域用プライマー)

hVH17a.1 atggactgsayytggagvdtc (SEQ ID No=1)

hVH2a.1 tccacrcctcctgctrctgac (SEQ ID No=2)

hVH3a.1 gggcygagstggvtttct (SEQ ID No=3)

hVH4a.1 tcctcctsctggcagct (SEQ ID No=4)

hVH5.1 tcaaccgccatcctcgccct (SEQ ID No=5)

hVH6.1 ctccttcctcatttcctgcc (SEQ ID No=6)

Primer 1 3' Mix (10 μ M each) (C 領域用プライマー)

hIGHG1-4out agtccttgaccaggcagccca (SEQ ID No=7)

hIGHMout attctcacaggagacgagggg (SEQ ID No=8)

以下に上記反応で用いたプライマー(L鎖用)の配列を示す。

PCR 1

5' primer

hKV12.1 atgaggstcccygctcagctc (SEQ ID No=9)

hKV3.1 ctcttcctcctgctactctggc (SEQ ID No=10)

hKV45.1 ctsttsctytggatctctg (SEQ ID No=11)

hKV6.1 tgggtttctgctgctctggg (SEQ ID No=12)

hKV7.1 atagggtccgggctccttg (SEQ ID No=13)

hLV12.1 cykctsctcctcactctc (SEQ ID No=14)

hLV3.1 ttctcctcctcgccctc (SEQ ID No=15)

hLV4.2-2 ccagcytgtgctgactcaatc (SEQ ID No=16)

hLV789.2 tcycahmctgtgstgacycag (SEQ ID No=17)

hLV6.1 ttttatgctgactcagcccc (SEQ ID No=18)

hLV7.1 ggcctggactcctctttctg (SEQ ID No=19)

hLV8.1 ggcctggatgatgcttc (SEQ ID No=20)

hLV9.1 tcctctgctcctcaccctc (SEQ ID No=21)

hLV10.1 cctgggtcatgctcctc (SEQ ID No=22)

hLV11.1 gcctgggctccactacttctc (SEQ ID No=23)

3' primer

hIGK1 ctgctcatcagatggcggga (SEQ ID No=24)

hIGL1 gacacacacyagtgtggccttgt (SEQ ID No=25)

P C R 2 の反応は P C R 1 の反応溶液 2 μ L を 18 μ L の P C R mix (最終濃度： 1x TAKARA ExTaq buffer, 0.25 mM dNTP, 各サブファミリーに対する Primer 2 0.5 μ M, ExTaq 0.05U/ μ L) に加え、 94°C, 3 min; (94°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 sec) x 40 cycles; 72°C, 5 min; 10 °C, ∞ 反応させた。

P C R 2

PCR 1 sol.	2.0
10x ExTaq buffer	2.0
2.5 mM dNTP	2.0
Primer 2 5' Mix (10 μ M each)	1.0
Primer 2 3' Mix (10 μ M each)	1.0
H ₂ O	10.0
<u>Takara ExTaq (0.5 U/ μ L)</u>	<u>2.0</u>
Total	20.0

94 °C, 3 min.

94 °C, 30 sec; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1.5 min. 40 cycles

72 °C, 5 min.

10 °C

PCR 2 の反応により PCR 1 で増幅した免疫グロブリン（抗体）遺伝子の可変部（V H）領域から定常部領域までのDNA配列を増幅した。

以下に上記反応で用いたプライマー（H鎖用）の配列を示す。

Primer2 Mix

Primer 2 5' Mix (10 μM each)

hVH17a. 2 ggtgcagctkgtrcattctgg (SEQ ID No=26)

hVH2a. 2 caccttgarggagtctgggtcc (SEQ ID No=27)

hVH3a. 2 aggttdcarctgktggagtcyg (SEQ ID No=28)

hVH4a. 2 ggtcctgtcycagstgcagct (SEQ ID No=29)

hVH5a. 2 gtgcagctggtgcaagtctgg (SEQ ID No=30)

hVH6. 2 gcagcagtcaggtccaggact (SEQ ID No=31)

Primer 2 3' Mix (10 μM each)

hIGHG1-4s aagacsgatggcccttggtg (SEQ ID No=32)

hIGHM aagggttggcggatgcact (SEQ ID No=33)

以下に上記反応で用いたプライマー（L鎖用）の配列を示す。

PCR 2

5' primer

hKV1. 2 ccagatgaccaggatctccatc (SEQ ID No=34)

hKV2. 2 ccagtggggatattgtgatgac (SEQ ID No=35)

hKV3. 2 cagtctccagccaccctgtct (SEQ ID No=36)

hKV4. 2 gtgatgacccagtcctccagac (SEQ ID No=37)

hKV 5. 2 acactcacgcagtcctccagca (SEQ ID No=38)

hKV67. 2 ttgtgctgacycagtcctccag (SEQ ID No=39)

hLV1. 2 agtctgtgctgacgcagccgc (SEQ ID No=40)

hLV23. 2 tgactcagccwcytcgtgtc (SEQ ID No=41)

hLV4. 2-3 caatcatcctctgcmtctgc (SEQ ID No=42)

hLV5. 2-2 gactcagccaacctccctctc (SEQ ID No=43)

hLV6. 2 gactcagccccactctgtgtc (SEQ ID No=44)

hLV789. 2 tcycagmctgtgstgacycag (SEQ ID No=45)

hLV1011. 2 tgactcagccmcmctckgtgtc (SEQ ID No=46)

3' primer

hIGK2 gacagatggtgccagccacagt (SEQ ID No=47)

hIGL2 cttgragctcctcagaggagg (SEQ ID No=48)

P C R 産物を、アガロースゲルを用いて解析、精製し、p T 7 B 1 u e - T v e c t o r (Novagen, Madison, WI) にクローニングし、抗体遺伝子配列を決定した。既存のデータベースに入っている抗体遺伝子の配列と比較したものを図 9 及び 10 に示す。図 9 は L鎖の配列であり、図 10 は H鎖の配列である。各図ともに、上側に示した塩基配列が実際に 1 個の B リンパ球から R T - P C R で增幅し、配列決定した抗体遺伝子の配列であり、下側に示した塩基配列がデータベース

に登録されていた既存の配列である。

図 9

1st 塩基配列 (配列決定した抗体遺伝子)

File Name: L1 (SEQ ID No=49)

2nd 塩基配列 (既存の配列)

File Name: L33038 (SEQ ID No=50)

図 10

1st 塩基配列 (配列決定した抗体遺伝子)

File Name: H1 (SEQ ID No=51)

2nd 塩基配列 (既存の配列)

File Name: AF062204 (SEQ ID No=52)

図 9 及び 10 中の 94 % および 98 % は、配列決定した抗体遺伝子と既存の配列との相同性を意味する。相同性の値から、配列決定した抗体遺伝子は既存の配列とは異なる抗原に対応した抗体だと推測された。

産業上の利用可能性

本発明では、血液中のリンパ球 1 個が 1 つのマイクロウェルに入るよう添加し、これらのリンパ球を抗原で刺激する。ここでいう抗原とは感染症における細菌やウィルスなどの病原体をさす。血液中のリンパ球は 1 個 1 個がそれぞれ別々の抗原に反応する。本発明のマイクロウェルアレイチップを用いれば、例えば、抗原に反応する B リンパ

球を検出することができる。さらに、検出された抗原特異的 B リンパ球を回収することができる。抗原特異的 B リンパ球を回収できると、マイクロウェルとは別のチューブ中で、抗原（病原体）に反応する抗体遺伝子を、例えば、PCR などにより増幅できる。抗原特異的 B リンパ球を検出したマイクロウェル中で抗原（病原体）に反応する抗体遺伝子を増幅することもできる。

本発明の抗原特異的リンパ球の検出法は、マイクロウェルアレイチップを用いて行う。そのため、検出した抗原特異的リンパ球はマイクロウェルの中にあるため、その細胞の加工（細胞の分取・DNA/RNA の調製）が容易である。また、細胞の抗原に対する応答を検出できる。抗原だけでなく、様々な刺激に対する細胞の応答、また、細胞の応答に対する様々な試薬等の影響を解析することが可能である。

感染症に対しては、病原体特異的リンパ球を検出し、病原体特異的抗体遺伝子をクローニングすることにより、がんに対しては腫瘍特異的リンパ球を検出し、腫瘍特異的抗体遺伝子、腫瘍特異的 T 細胞受容体遺伝子をクローニングすることにより、抗体を用いた抗体療法、また、T 細胞受容体遺伝子を用いた遺伝子治療が可能になると期待される。

自己免疫疾患においては自己反応性リンパ球を検出し、自己抗体、自己抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子をクローニングすることにより、

アレルギーにおいてはアレルゲン特異的リンパ球を検出し、IgE 遺伝子をクローニングすることにより、正確な病因・病態の把握を行い、病因に対応した治療や治療効果のモニターを行うことができる。

さらに、すべてのリンパ球を対象に網羅的に個人の持つすべての抗体遺伝子や T 細胞受容体遺伝子をモニターすることにより、和漢薬の免疫機能に対するモニターや病原体に対する免疫応答を予測することによりテーラーメード医療に応用することができる。

請求の範囲

- 1 複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体リンパ球を格納し、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するため用いられるマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つのリンパ球のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップ。
- 2 前記マイクロウェルは、円筒形、直方体、逆円錐形、若しくは逆角錐形またはこれらの2つ以上を組合せた形状である、請求項1に記載のマイクロウェルアレイチップ。
- 3 マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径の1~2倍の範囲であり、かつマイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとするリンパ球の直径の1~2倍の範囲である、請求項1または2に記載のマイクロウェルアレイチップ。
- 4 1個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップ。
- 5 前記マイクロウェルは、直径5~100 μm であり、深さ5~100 μm である請求項4に記載のマイクロウェルアレイチップ。

6 前記被検体リンパ球は培養液とともにマイクロウェルに格納されている請求項4又は5に記載のマイクロウェルアレイチップ。

7 前記被検体リンパ球は血液由来である請求項4～6のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

8 前記被検体リンパ球はBリンパ球またはTリンパ球である請求項4～7のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

9 請求項4～8のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、被検体リンパ球を刺激し、抗原に反応する被検体リンパ球を検出することを含む、抗原特異的リンパ球の検出方法。

10 抗原に反応する細胞の検出を、Caイオン依存性蛍光色素を用いて行う請求項9に記載の方法。

11 抗原に反応する細胞の検出を、抗原により刺激され活性化した被検体リンパ球細胞の表面に発現する活性化マーカータンパク質を指標として行う請求項9に記載の方法。

1 2 抗原に反応する細胞の検出を、被検体リンパ球細胞内蛍光物質が発する蛍光の偏光度を指標として行う請求項 9 に記載の方法。

1 3 抗原に反応する細胞の検出を、被検体リンパ球細胞の増殖または抗体産生を指標として行う請求項 9 に記載の方法。

1 4 抗原がタンパク質、ペプチド、DNA、RNA、脂質、糖鎖、または有機高分子化合物である請求項 9 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

1 5 抗原が、細菌、ウィルス、自己抗原、がん抗原またはアレルゲンである請求項 9 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

1 6 請求項 9 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法により、検出された抗原に反応する被検体リンパ球をマイクロウェルから回収することを含む、抗原特異的リンパ球の製造方法。

1 7 ある抗原に特異的に反応するリンパ球（以下、抗原特異的リンパ球という）を 1 個選択し、次いでこの 1 個の抗原特異的リンパ球から抗原特異的抗原受容体遺伝子をクローニングする方法。

1 8 前記 1 個の抗原特異的リンパ球の選択は、1 個の被検体リンパ球が含まれるマイクロウェルを複数有する抗原特異的リンパ球検出用マイクロウェルアレイチップの各マイクロウェルに抗原を添加し、次

いで、抗原に反応したリンパ球を検出し、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことにより行う請求項 1 7 に記載の方法。

1 9 抗原特異的リンパ球は、頻度が 0. 1 % 以下である請求項 1 7 に記載の方法。

2 0 抗原特異的リンパ球を、細胞溶解剤を用いて溶解し、 R T - P C R を用いて抗原特異的抗原受容体遺伝子を增幅する請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

2 1 R T - P C R が、逆転写酵素による c D N A 調製の後、抗原受容体遺伝子用のプライマーミックスを用いて P C R を 2 回行うことにより行う請求項 2 0 に記載の方法。

2 2 抗原特異的リンパ球が B リンパ球または T リンパ球である請求項 1 7 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

2 3 抗原特異的抗原受容体遺伝子が、抗原特異的リンパ球が B リンパ球である場合には免疫グロブリン遺伝子であり、 T リンパ球である場合には T 細胞受容体遺伝子である請求項 2 2 に記載の方法。

2 4 抗原特異的リンパ球が B リンパ球であり、抗原特異的免疫グロ

ブリン遺伝子がクローニングされる請求項 17～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

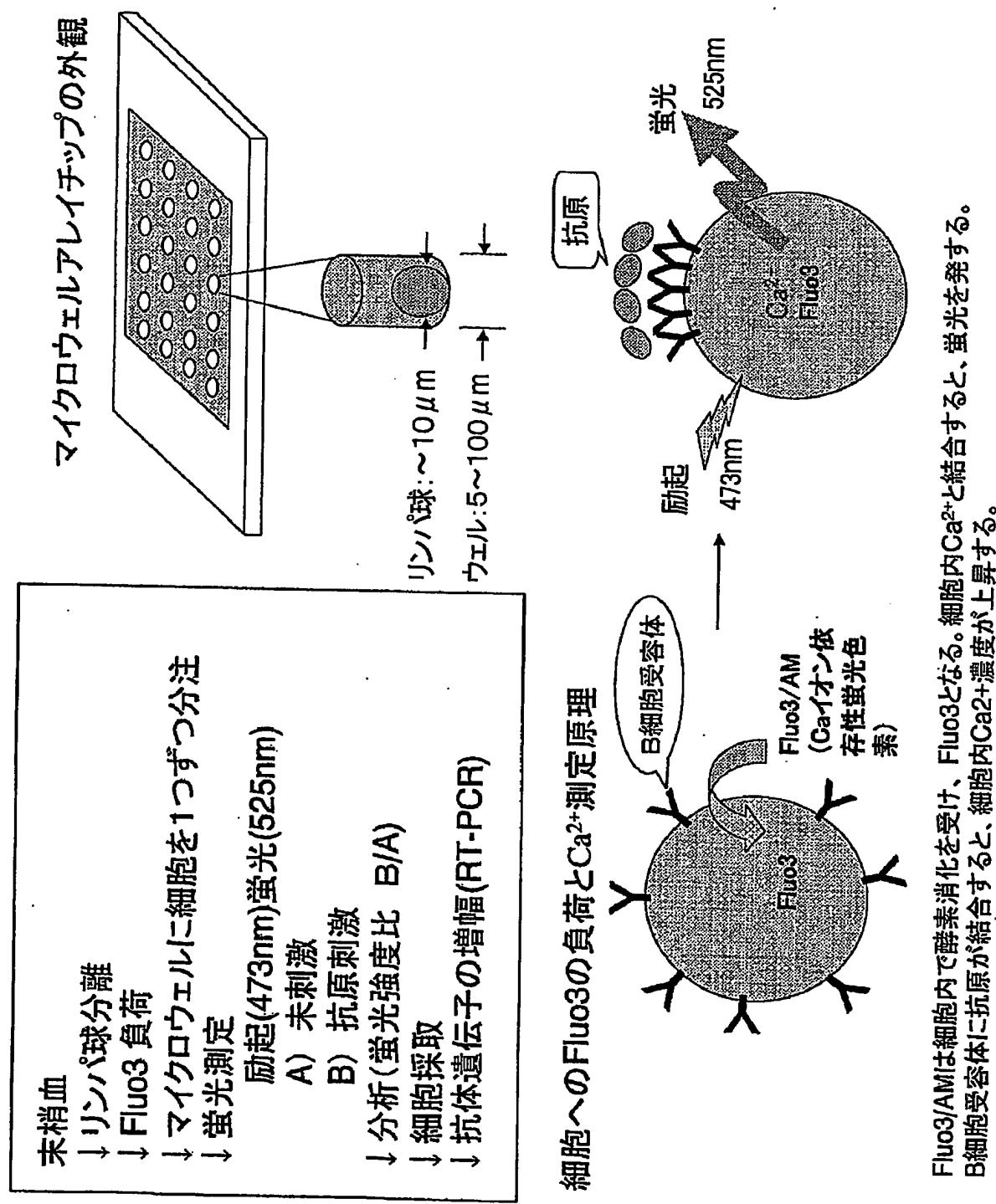
25 抗原特異的リンパ球が T リンパ球であり、抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子がクローニングされる請求項 17～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

26 遺伝子の増幅を、検出された抗原特異的リンパ球をマイクロウェルから取り出すことなく、マイクロウェル中で行う請求項 18～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

27 請求項 24 に記載の方法によりクローニングされた抗原特異的免疫グロブリン遺伝子を用いて、モノクローナル抗体を製造する方法。

28 請求項 25 に記載の方法によりクローニングされた抗原特異的 T 細胞受容体遺伝子を用いて、遺伝子治療用材料を製造する方法。

図 1



図

2

細胞の分注と抗原刺激法

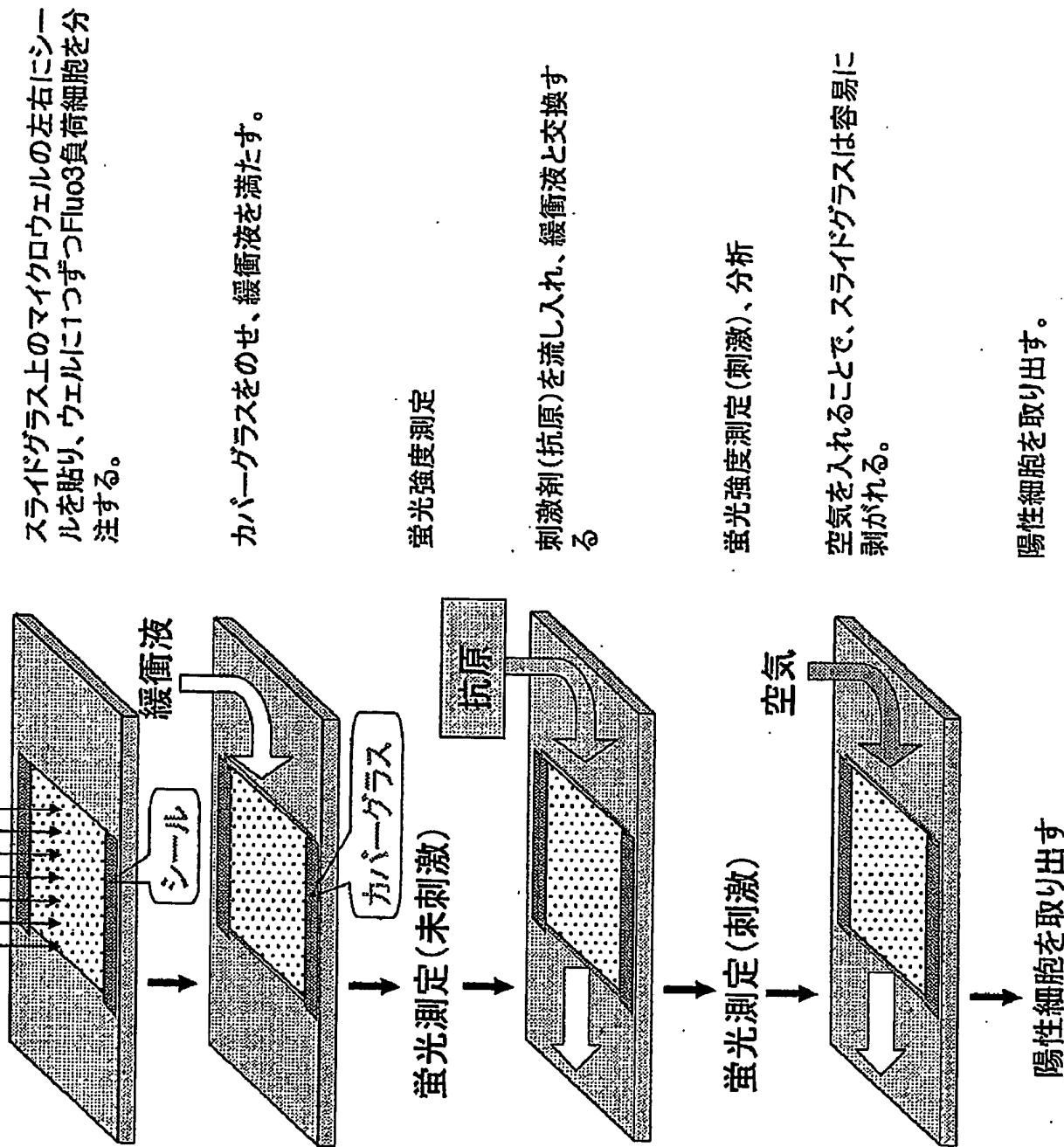


図 3

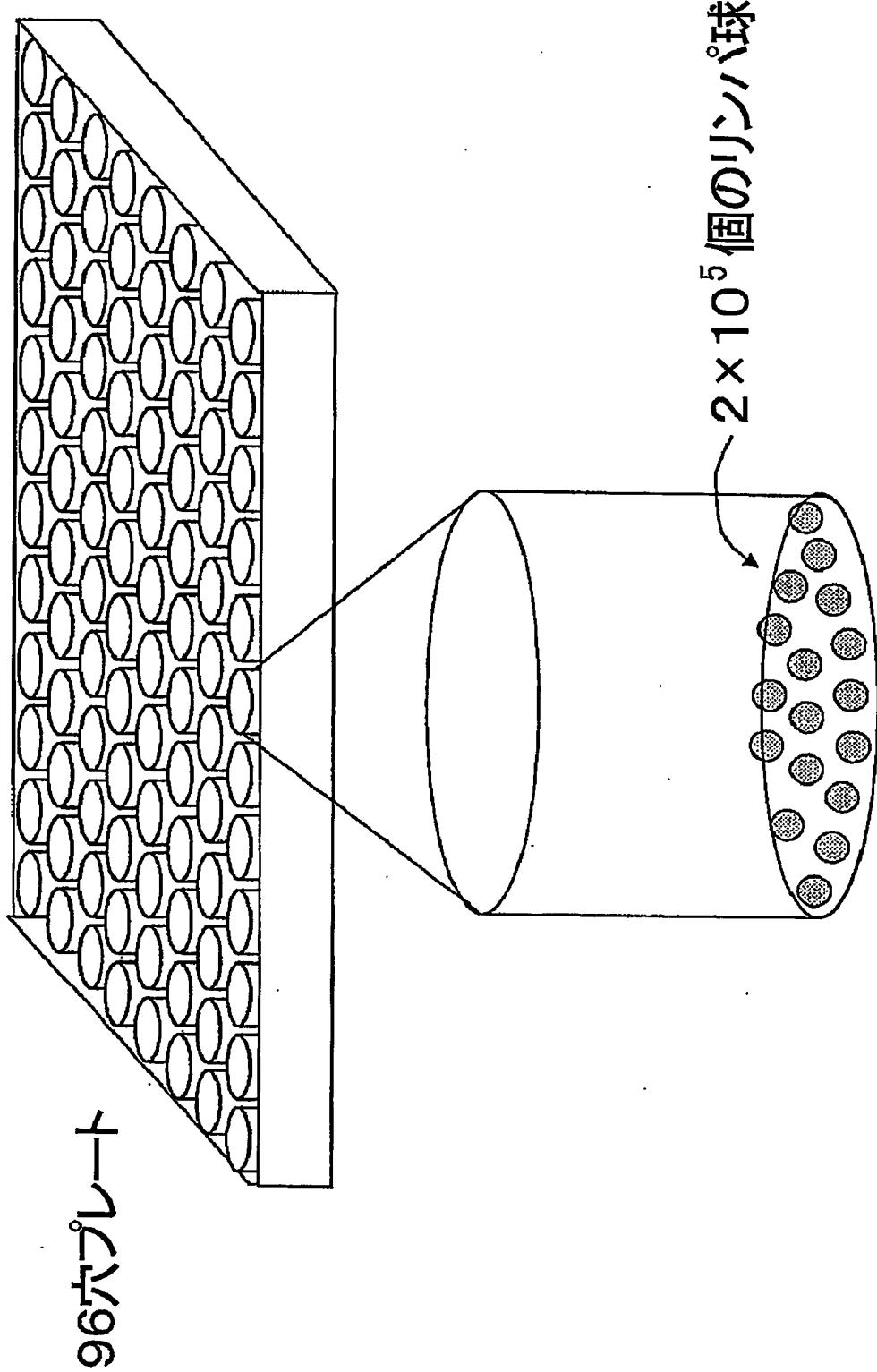
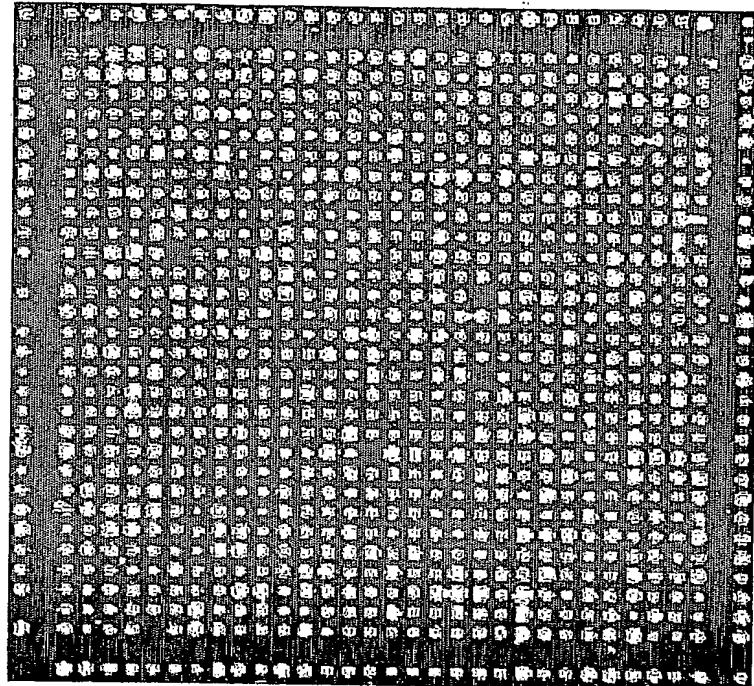
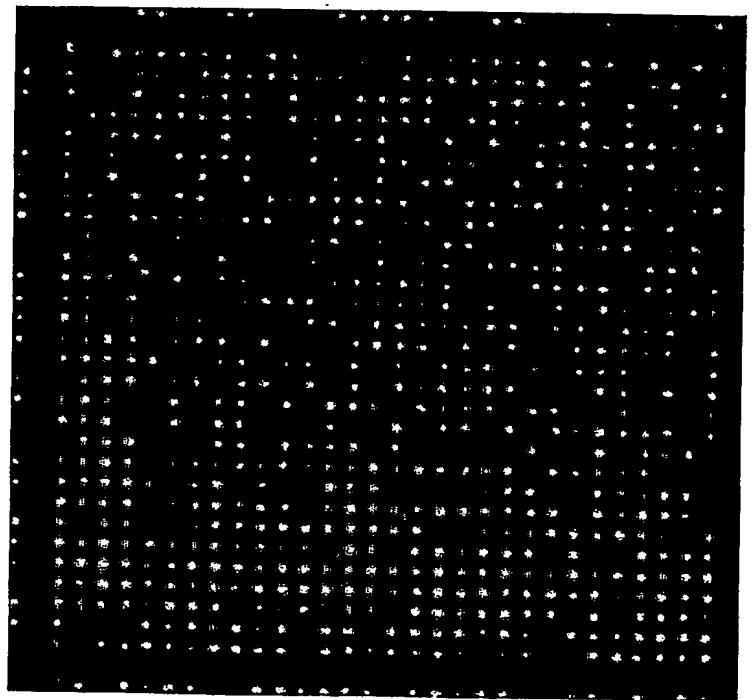


図 4

マイクロアレイスキャナー



蛍光顕微鏡



1クラスター=30×30ウエル

図 5

HBsタンパク添加後
刺激前

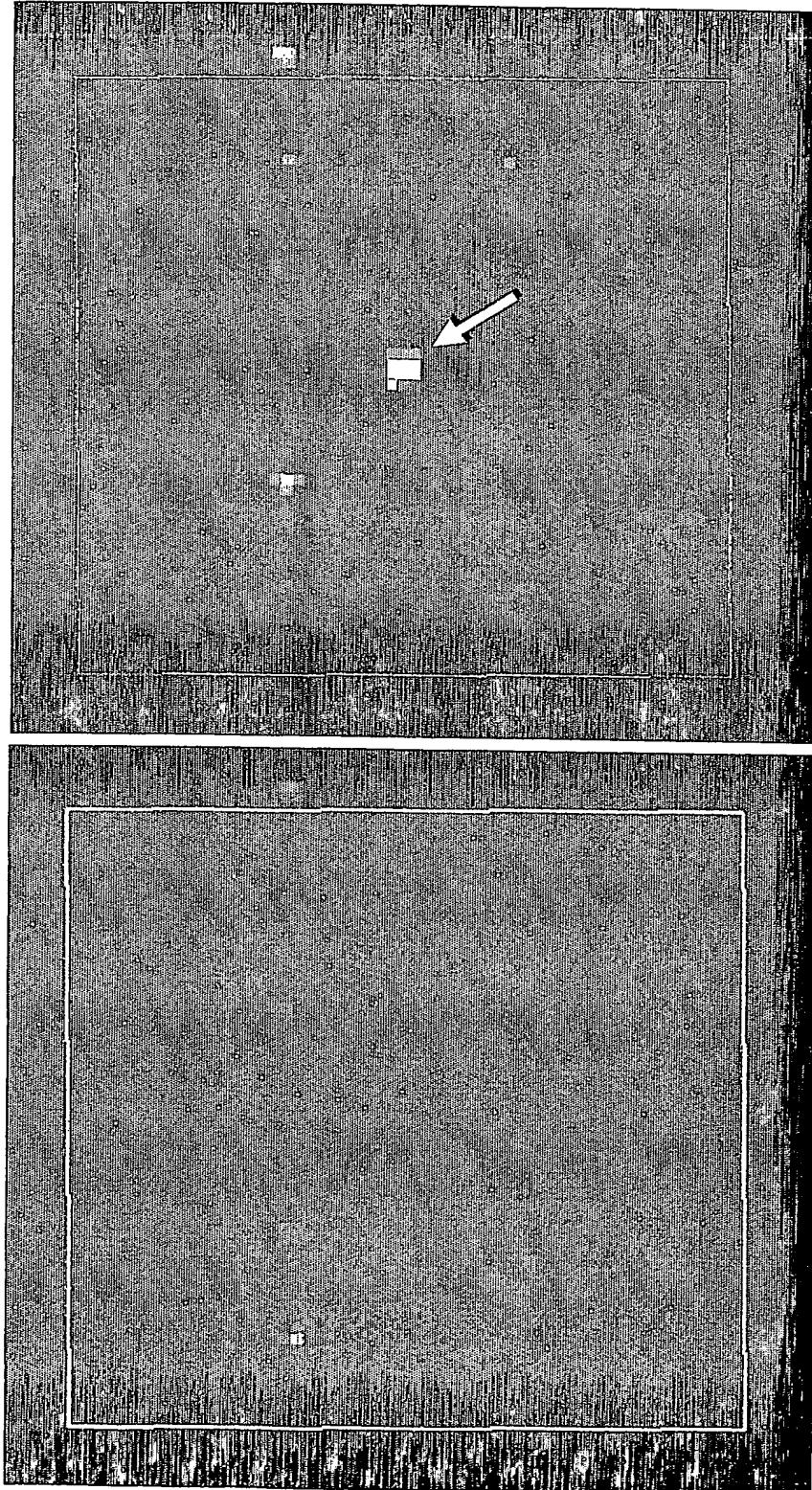


図 6

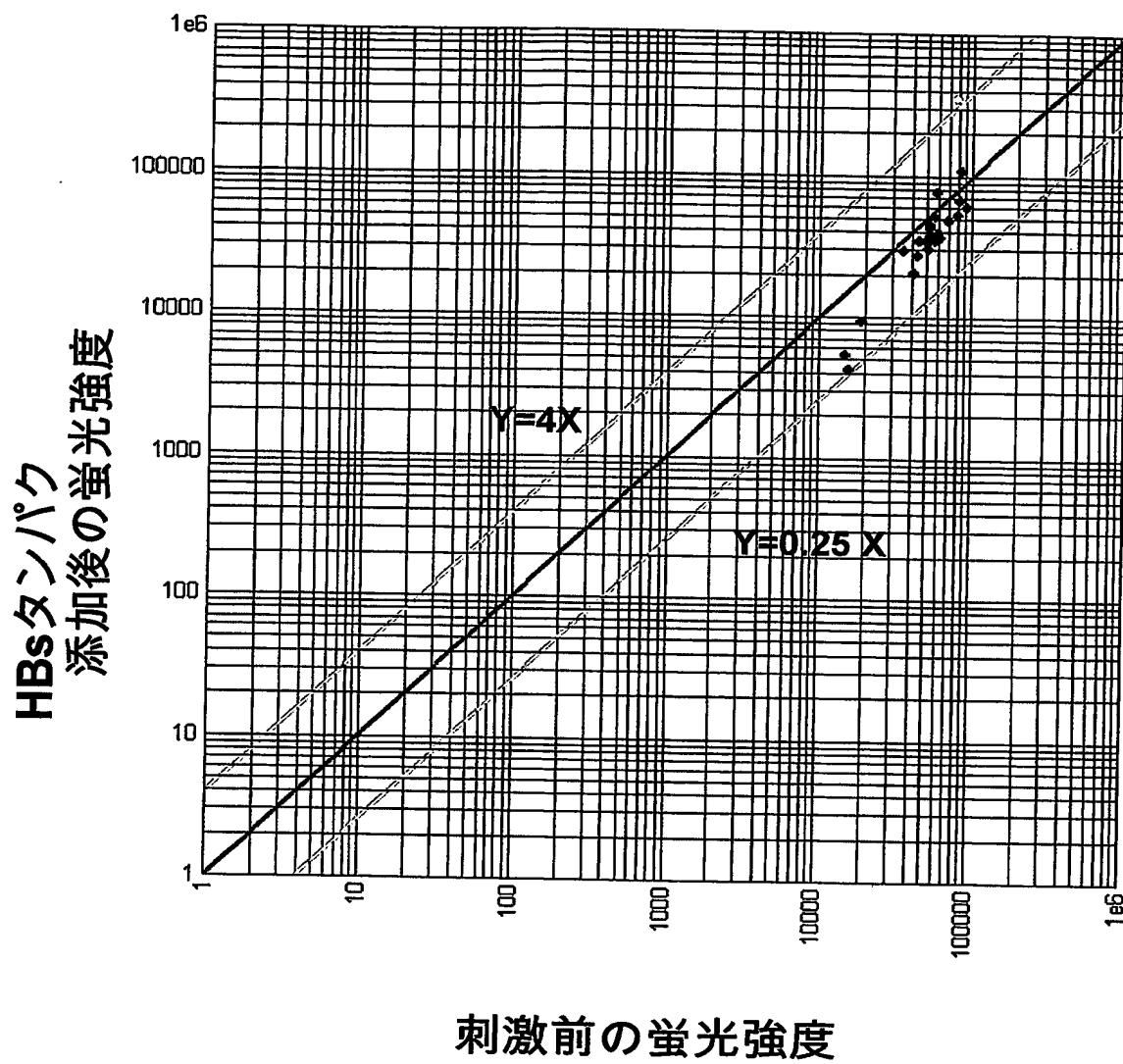
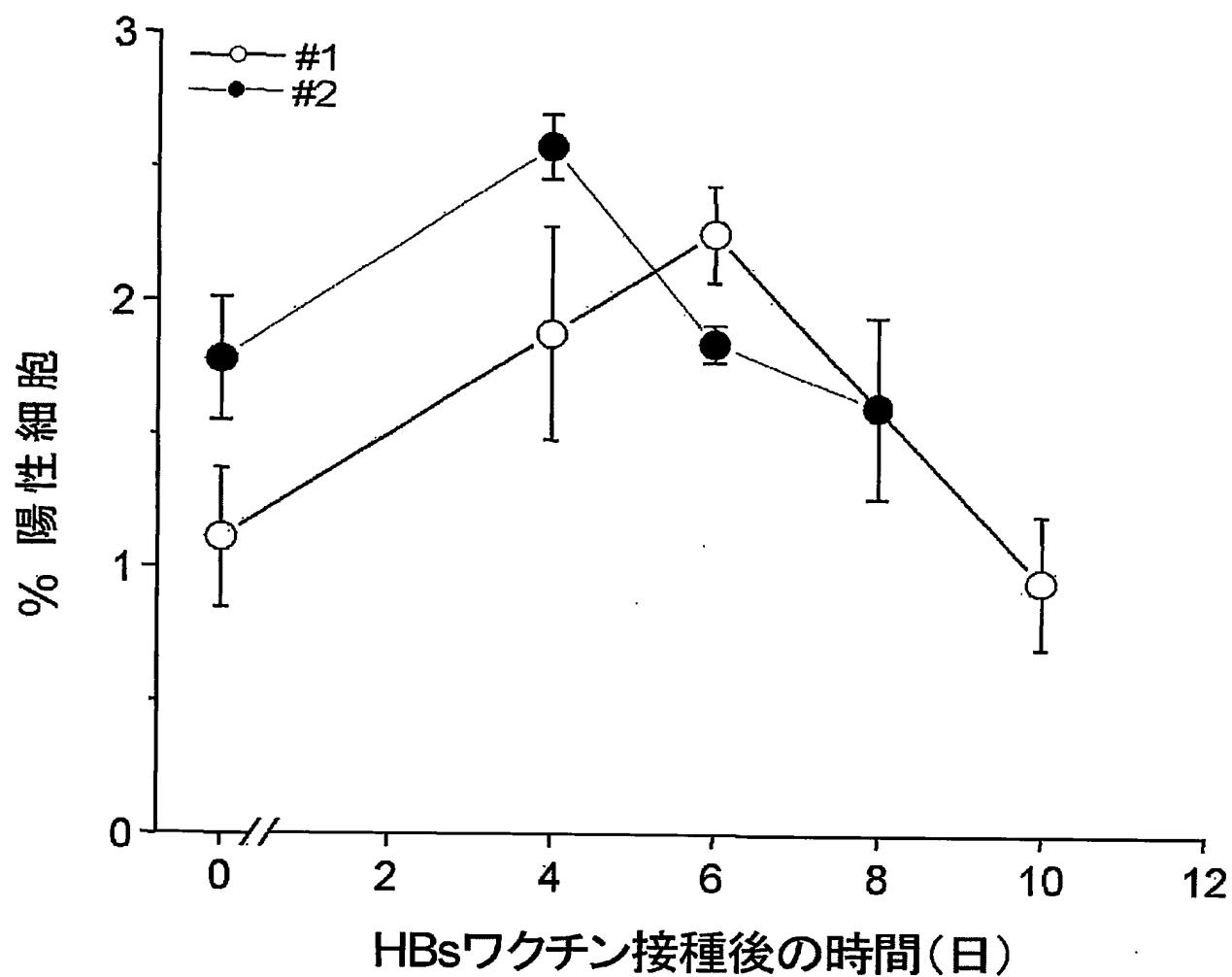


図 7

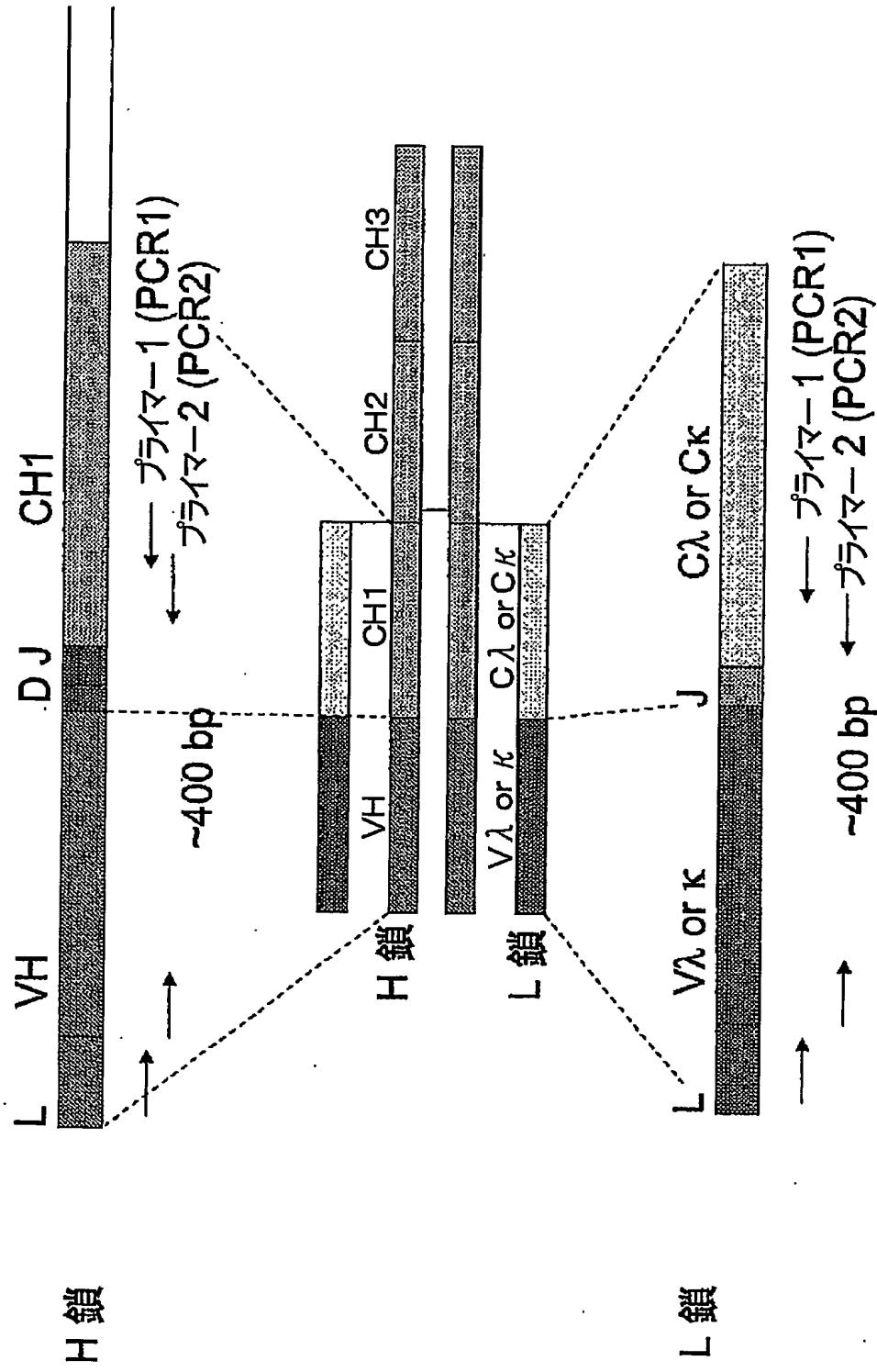


図

B細胞の抗体遺伝子の增幅

抗原特異的B細胞
 ↓ RT
 ↓ PCR1
 ↓ PCR2

抗体の構造



1st: 1 cagttccaggccacccctgttttgtctccaggggcaaaggtagccacccctctcctgcggg 60
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 2nd: 55 cagttccaggccacccctgttttgtctccagggg-aaag-agccacccctctcctgcaggg 112

1st: 61 ccagtcaggatgttagcancatcttagccctggtagccaaacagaaacactggccaggctccc 120
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 2nd: 113 ccagtcaggatgttagcacttagcggtagccaaacagaaac-ctggccaggctccc 171

1st: 121 aggctccctnatcttatgtgcatctcaaacaggcccactggcatcccaaggccatggtaagtgg 180
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 2nd: 172 aggctccctatgtgcatc-caacaggcccactggcatcccaaggccaccttcagttgg 230

1st: 181 cagttgggtctgggacagacttcacttcaccatcancaggccctagaggctgaagattttgc 240 ⑨
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 2nd: 231 cagttgggtctgggacagacttcacttcaccatcaccatcaggccctagaggctgaagattttgc 290

1st: 241 agtttattactgtcancaaggtagataactggcccttcacttcggggaggggaccaaggc 300
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 2nd: 291 agtttattactgtcaggtagcaactgggtgcttcacttcggggaggggaccaagg- 349

1st: 301 tggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtc 335
 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 2nd: 350 tggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtc 384

ggtcctgtctcagggtgcagctgcaggcagtcggcaggctggccaggactggtgaaaggccttcggag 60
||||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
ggtcctgtcccaggctgcagggtgcagctgcaggcagg-actggtgaaaggccttcggag 105.

accctgtccctcacctgcaactgtctccatcaggcgttagtactactgg 120
||||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
accctgtccctcacctgcaactgtctccatcaggcgttagtactactgg 165

ggctggatcccgccagccccaggaaaggcgtggagtggttattatgt 180
||||| .||||| .||||| .||||| .||||| .||||| .||||| .||||| .
ggctggatcccgccagccccaggaaaggcgtggagtggttattatgt 225

aaagaaccaggttctccctgaagctgtggaccggccggcagacacggctgtgttattac 300
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
aaagaaccaggttctccctgaagctgtggaccggccggcagacacggctgtgttattac 345

1st: 301	..	tgtgcgagacag	312
		·	
2nd: 346		tgtgcgagacag	357

SEQUENCE LISTING

<110> Atsushi Muraguchi, Hiroyuki Kishi, Eiichi Tamiya, Masayasu Suzuki

<120> Micro-well array chip for assay of antigen specific lymphocyte, assay method and preparation method of antigen specific lymphocyte, and method of cloning gene of antigen receptor of antigen specific lymphocyte

<130> A35087H

<160> 52

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

atggactgsa yytggagvdt c 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tccacacrctcc tgctctgac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gggc~~cy~~gagst ggvttt~~ty~~ct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tcctcctsct ggtggcagct 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

tcaaccggcca tcctcgccct 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ctccttcctc atcttcctgc c 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

agtccttgac caggcagccc a 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

attctcacag gagacgaggg g 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

atgaggstcc cygctcagct c 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ctcttcctcc tgctactctg gc 22

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

ctsttsctyt ggatctctg 19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

tgggttctg ctgctctggg 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

atagggtccg gggctccttt g 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

cykctscfcc tcactctcct c 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ttctcctcct cggcctcctc t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

ccagcytgtg ctgactcaat c 21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

tcycagmctg tgstgacyca g 21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

tttatgctg actcagcccc 20

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ggcctggact cctctttc tg 22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

ggcctggatg atgcttctcc tc 22

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

tcctctgctc ctcaccctcc t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

cctgggtcat gtcctcctg a 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

gcctgggctc cactacttct c 21

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

ctgctcatca gatggcggga 20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

gacacacyag tgtggccttg t 21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

ggtgcagctk gtrcartctg g 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

caccttgarg gagtctggtc c 21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

aggtdcarct gktggagtcy g 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

ggtcctgtcy cagstgcagc t 21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

gtgcagctgg tgcaagtctgg 20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

gcagcagtca ggtccaggac t 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

aagacsgatg ggcccttgg g 21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

aagggttggg cggatgcact 20

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

ccagatgacc cagtctccat c 21

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

ccagtgggta tattgtgatg ac 22

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

cagtctccag ccaccctgtc t 21

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

gtgatgaccc agtctccaga c 21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

acactcacgc agtctccagc a 21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

ttgtgctgac ycagtctcca g 21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

agtctgtgct gacgcagccg c 21

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

tgactcagcc wcyctcmgtg tc 22

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

caatcatcct ctgcmtctgc 20

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 43

gactcagcca acctccctct c 21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 44

gactcagccc cactctgtgt c 21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 45

tcycagmctg tgstgacyca g 21

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 46

tgactcagcc mcmctckgtg tc 22

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 47

gacagatgg t gcagccacag t 21

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 48

cttgragctc ctcagaggag gg 22

<210> 49

<211> 335

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 49

cagtctccag ccaccctgtc tttgtctcca ggggcaaagt agccaccctc tcctgcenggg 60
ccagtcagag tggtagcanc tacttagcct ggtaccaaca gaaacactgg ccaggctccc 120
aggctcctna tctatgatgc atctcaacag ggccactggc atcccagcca ggttaagtgg 180
cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcancagc ctagagcctg aagattntgc 240
agtttnattac tgcancagc gatatcaactg gcctctcact ttccggcggag ggaccaaggc 300
tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtc 335

<210> 50

<211> 330

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 50

cagtctccag ccaccctgtc tttgtctcca ggggaaagag ccaccctctc ctgcagggcc 60
agtcagagtg ttagcagcta cttagcctgg taccacacaa aacctggcca ggctcccagg 120
ctcctcatct atgatgcac caacagggcc actggcatcc cagccacctt cagtggcagt 180
gggtctggga cagacttcac tctcaccatc agcagcctag agccitgaaga ttttgcagg 240
tattactgtc agcagcgtag caactgggtg ctcactttcg gcggagggac caaggtggag 300
atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 330

<210> 51

<211> 312

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 51

ggtcctgtct caggtgcagc tgcaggcagt cgggcccagt gactggtgaa gccttcggag 60
accctgtccc tcacctgcac tgtctctgggt ggctccatca gcagtagtagtttactactgg 120
ggctggatcc gccagcccccc agggaaagggg ctggagtgga ttgggagtttattatagt 180
gggagcacct actacaacc cgtccctcaag agtgcgagtca ccataatccgt agacacgtcc 240
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccc cagacacggc tgtgttattac 300
tgtgcgagac ag 312

<210> 52

<211> 310

<212> DNA

<213> Human antibody

<400> 52

ggtcctgtcc cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaaagc cttcggagac 60
cctgtccctc acctgcactg tctctgggtgg ctccatcagc agtagtagtttactactgggg 120
ctggatccgc cagccccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagttatcttattatagtgg 180
gagcacctac tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtac acacgtccaa 240
gaaccaggttc tccctgaagc tgagctctgt gaccgcccgc gacacggctg tgtattactg 300

tgcgagacag 310

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, G01N37/00, C12M1/34, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/50, G01N33/15, G01N37/00, C12M1/34, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-506200 A (Trustees of Tufts college), 26 February, 2002 (26.02.02), & AU 3065199 A & WO 99/45357 A & CA 2321558 A & EP 1060239 A & US 6210910 B	1-16
X	JP 2001-504323 A (Ortho-Mcneil Pharmaceutical Inc.), 03 April, 2001 (03.04.01), & EP 937251 A & AU 3912497 A & WO 98/10284 A	17-28

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 December, 2003 (25.12.03)Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/50, G01N33/15, G01N37/00, C12M1/34, C12Q1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N33/50, G01N33/15, G01N37/00, C12M1/34, C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-506200 A (トラスティーズ・オブ・タフ ツ・カレッジ) 2002. 02. 26 & AU 3065199 A & WO 99/45357 A & CA 2321558 A & EP 1060239 A & US 6210910 B	1-16
X	JP 2001-504323 A (オーソーマクニール・ファー マシューチカル・インコーポレイテッド) 2001. 04. 03 & EP 937251 A & AU 3912497 A & WO 98/10284 A	17-28

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 12. 03

国際調査報告の発送日

10. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中 基典

2 J 9507



電話番号 03-3581-1101 内線 3251